

Aus der
Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie
Direktor: Prof. Dr. med. Gustav Steinhoff



**Einfluss der ischämischen Remotepräkonditionierung
auf die Mobilisierung endothelialer Progenitorzellen**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von

Philipp Sebastian Köntges
aus Würzburg

Rostock, 2017

Dekan: Prof. Dr. med. univ. Emil Christian Reisinger, MBA

Tag der Einreichung: 17. März 2017

Tag der mündlichen Verteidigung: 13. März 2018

Dekan: Prof. Dr. med. univ. Emil Christian Reisinger, MBA

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Gustav Steinhoff

Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie, Universitätsmedizin Rostock

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Christian Junghanß

Klinik für Hämatologie, Onkologie und Palliativmedizin, Universitätsmedizin Rostock

3. Gutachter: Univ. Prof. Dr. med. Ingo Kutschka, MBA

Klinik für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie, Universitätsmedizin Göttingen

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Ischämische Herzerkrankung	1
1.1.1	Therapie der koronaren Herzerkrankung	1
1.1.2	Therapie des akuten Koronarsyndroms.....	1
1.2	Ischämische (Remote)-Präkonditionierung	2
1.2.1	Klinische Bedeutung	2
1.2.2	Mechanismen.....	3
1.3	Endotheliale Progenitorzellen	5
1.3.1	Klinische Bedeutung	5
1.3.2	Mobilisation	5
1.3.3	Identifikation	6
1.4	Zielsetzung	7
2	Material und Methoden	8
2.1	Hardware	8
2.2	Software.....	8
2.3	Verbrauchsmaterialien.....	8
2.4	Lösungen und Reagenzien.....	9
2.5	Patientenrekrutierung	9
2.6	RIPHeart – Studie.....	9
2.7	Untersuchungszeitpunkte	11
2.8	Zellisolation	11
2.9	Zellzählung	12
2.10	Durchflusszytometrie	12
2.10.1	Probenvorbereitung für die Durchflusszytometrie.....	12
2.10.2	Durchführung der Durchflusszytometrie	13
2.10.3	Auswertung	13
2.11	CFU-Hill	16
2.11.1	Durchführung.....	16
2.11.2	Auswertung	16
2.12	Statistik	17
2.12.1	Normierung der erhobenen Werte	17

2.12.2	Statistische Aufarbeitung der Daten.....	17
3	Ergebnisse.....	18
3.1	Studienpopulation	18
3.2	Durchflusszytometrie (FACS).....	18
3.2.1	Vitale PBMC.....	19
3.2.2	CD184+ Zellen	20
3.2.3	CD14+ Monozyten	21
3.2.4	ISHAGE CD34+	22
3.2.5	ISHAGE CD34+ CD133+.....	23
3.2.6	ISHAGE CD34+ CD117+.....	24
3.2.7	ISHAGE CD34+ CD184+.....	25
3.2.8	ISHAGE CD34+ CD133+ CD117+	26
3.2.9	ISHAGE CD34+ CD133+ CD184+	27
3.2.10	ISHAGE CD133+	28
3.2.11	ISHAGE CD133+ CD117+	29
3.2.12	ISHAGE CD117+	30
3.3	Koloniebildung (CFU-Hill)	31
3.3.1	Analyse über alle Zeitpunkte	31
3.3.2	Analyse über drei Zeitpunkte	32
4	Diskussion	34
4.1	Zellpopulationen in der Durchflusszytometrie	34
4.1.1	Vitale PBMC.....	34
4.1.2	CD184+ PBMC	35
4.1.3	Endotheliale Progenitorzellen	35
4.1.4	Limitationen.....	38
4.2	CFU-Hill	42
4.2.1	Limitationen.....	42
4.3	Fazit	43
	Zusammenfassung	45
	Thesen.....	46
	Literaturverzeichnis	47
	Anhang	I

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	I
Tabellenverzeichnis.....	II
Abkürzungsverzeichnis.....	III
Selbständigkeitserklärung	V

1 Einleitung

Als weltweit häufigste Todesursache [111] kommt der ischämischen Herzerkrankung sowohl im klinischen Alltag als auch im Bereich der Forschung eine besondere Bedeutung zu. Selbst bei optimaler Therapie weist diese Erkrankung eine hohe Morbidität und Mortalität auf, so dass neue Therapiestrategien benötigt werden. Die Reduktion des Einflusses des Ischämie-Reperfusionsschadens (IRI) stellt einen solchen Ansatz dar. [39]

1.1 Ischämische Herzerkrankung

Bei der Betrachtung der ischämischen Herzerkrankung ist eine chronische Form, die koronare Herzkrankheit (KHK), von einer akuten Form, dem akuten Koronarsyndrom (ACS), zu unterscheiden. „Die koronare Herzerkrankung (KHK) ist die Manifestation der Artherosklerose an den Herzkranzarterien.“ [18] Sie führt häufig zu einem Missverhältnis zwischen Sauerstoffbedarf und Sauerstoffangebot im Herzmuskel. Unter dem Begriff „Akutes Koronarsyndrom“ werden dabei die Phasen der koronaren Herzerkrankung zusammengefasst, die unmittelbar lebensbedrohlich sind. Hierzu gehören die instabile Angina, der akute Myokardinfarkt und der plötzliche Herztod. [18]

1.1.1 Therapie der koronaren Herzerkrankung

„Wesentliche Ziele der Behandlung der chronischen KHK sind eine Steigerung der Lebensqualität [...], die Prävention der klinischen Manifestation der KHK, insbesondere des Myokardinfarktes und der Herzinsuffizienz sowie die Reduktion der Sterblichkeit.“ [18] Therapeutisch spielen neben der interventionellen Revaskularisation auch eine medikamentöse Sekundärprophylaxe sowie eine Modifikation der beeinflussbaren Risikofaktoren eine große Rolle. [18]

1.1.2 Therapie des akuten Koronarsyndroms

Das ACS wird bei der Wahl der Therapie nach der Präsenz von persistierenden ST-Hebungen im EKG eingeteilt. Im Gegensatz zur chronischen KHK steht bei der Therapie des ACS das Abwenden der unmittelbaren Lebensgefahr im Vordergrund. In der primären Therapie des ACS hat, neben den allgemeinen Basismaßnahmen, die medikamentöse Therapie die größte Bedeutung. Angriffspunkte sind die Steigerung des Sauerstoffangebotes, die Senkung des myokardialen Sauerstoffbedarfs, eine adäquate Analgesie sowie eine Antikoagulation und eventuell eine Thrombolyse. Im stationären Setting werden diese Maßnahmen durch interventionelle und operative Verfahren zur koronaren Revaskularisation ergänzt. Bei der Therapie des ACS kommt dem Faktor Zeit eine besondere Bedeutung zu, da der myokardiale Schaden mit der Ischämiezeit korreliert. Die Nachbehandlung des ACS stützt sich neben der Vermeidung von Risikofaktoren auf eine medikamentöse Thrombozytenaggregationshemmung und Plaquestabilisierung. [114]

1.2 Ischämische (Remote)-Präkonditionierung

Auf der Suche nach neuen Ansätzen für die Therapie der ischämischen Herzerkrankung konnten Murry *et al.* (1986) im Tiermodell zeigen, dass ein präinterventioneller Verschluss von Koronararterien mit anschließender kurzzeitiger Reperfusion des Herzmuskels vor einem länger andauernden Verschluss Selbiger inklusive abschließender Reperfusion, das histologisch gesicherte Infarktareal im Vergleich zu einer Kontrollgruppe deutlich reduzieren konnte [72]. Aufgrund dieses Experimentes wurde der Begriff der „ischämischen Präkonditionierung“ (IPC) geprägt. In der Praxis war dieses Verfahren jedoch schlecht umsetzbar, da durch ihre hohe Invasivität die Methode praktisch nur im Rahmen elektiver Herzoperationen vertretbar war [41]. Den Grundstein zur Lösung dieses Problems legten die Autoren Przyklenk *et al.* (1993) mit ihrem Konzept der ischämischen Remote-Präkonditionierung (RIPC). Die Autoren konnten zeigen, dass ein kurzzeitiger Verschluss des Ramus circumflexus (RCX) das Infarktareal bei anschließendem längerem Verschluss des Ramus interventricularis anterior (RIVA) signifikant senken konnte. Sie schlussfolgerten daraus, dass der Effekt der RIPC auf einer nicht lokal begrenzten Vermittlung durch Mediatoren beruhen könnte [83]. Im weiteren Verlauf wurde dieser Ansatz auf andere Organe übertragen, welche zur Kardioprotektion einer kurzzeitigen Ischämie ausgesetzt wurden. Diesen frühen Ansätzen war jedoch gemein, dass zur RIPC ein invasives Vorgehen notwendig war [41]. Birnbaum *et al.* (1997) konnten im Tiermodell einen protektiven Effekt der RIPC eines Skelettmuskels auf die postischämische Myokardschädigung zeigen. Jedoch praktizierten auch sie in ihren Versuchen ein invasives Vorgehen zur RIPC [14]. Fast zeitgleich veröffentlichten Oxman *et al.* (1997) die bisher am wenigsten invasive Methode durch externe Anlage eines Tourniquet zur Induktion der RIPC. Sie untersuchten in ihrer Studie jedoch nicht direkt die Myokardschädigung, sondern zeigten einen protektiven Effekt auf das Auftreten einer Reperfusionstachykardie [74]. Im Folgenden etablierte eine Londoner Arbeitsgruppe um Raymond J. MacAllister ein Verfahren, in dem der RIPC Stimulus im Rahmen von *in vivo* Studien mittels einer Blutdruckmanschette an den Extremitäten von freiwilligen Probanden erzeugt wurde [41]. Somit stand ein einfach praktizierbares und wenig invasives Verfahren [53] zur Verfügung.

1.2.1 Klinische Bedeutung

Das Konzept der IPC und seiner Varianten wurde bereits in verschiedenen Bereichen der Medizin evaluiert. Wichtige Gebiete sind operative und interventionelle Eingriffe am Herzen sowie am Gefäßsystem. Weitere Anwendungsmöglichkeiten wurden beispielsweise bei Operationen an der Leber, den Nieren sowie in der plastischen Chirurgie untersucht. Auch im Bereich der Schlaganfalltherapie liegt eine potenzielle Anwendungsmöglichkeit dieser Konzepte. Die Studienlage zeigt jedoch oftmals noch kein eindeutiges Bild, so dass weitere Untersuchungen nötig sind. [42]

Obwohl in präklinischen Studien eine starke Evidenz für die kardioprotektive Wirksamkeit der IPC gefunden wurde, gibt es nur wenig Evidenz in klinischen Studien. [42] So konnten beispielsweise positive Effekte auf die Arrhythmieraten, die kardiale Inotropie sowie die postoperative Verweildauer auf Intensivstation gezeigt werden [106], jedoch wurde ein solcher Effekt noch nicht für harte klinische Endpunkte, wie zum Beispiel die Reduktion der Mortalität, beschrieben. Kürzlich versuchten verschiedene große klinische Studien wie beispielsweise die RIPHeart-Studie (ClinicalTrials.gov

Identifiziert: NCT01067703) oder die ERICCA-Studie (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01247545) solche Effekte aufzuzeigen. [42]

Ischämische Postkonditionierung

Auch wenn die ischämische Postkonditionierung (IPost) nicht Thema dieser Arbeit ist, möchte ich auf Grund ihrer potentiellen klinischen Relevanz kurz auf das grundlegende Prinzip eingehen.

Bereits in den 1980er Jahren wurden erste Hinweise darauf gefunden, dass eine intermittierende Reperfusion eines bereits ischämischen Herzens kardioprotektiv wirken könnte. [39] Jedoch konnten erst Zhao *et al.* (2003) dieses Potential durch ihre Entdeckung, dass die wiederholte kurzzeitige Unterbrechungen der Reperfusion eines ischämischen Herzens zu einer Reduktion der Infarktgröße führt, in den Fokus der Fachwelt rücken. [115]

1.2.2 Mechanismen

Die der IPC sowie RIPC zugrunde liegenden Mechanismen sind bis heute nicht vollständig geklärt. Die Mechanismen der intrazellulären Signaltransduktion der RIPC sind vermutlich denen der IPC ähnlich. [39] Auf Grund der Komplexität der Mechanismen der intrazellulären Signaltransduktion und dem Fokus dieser Arbeit auf endotheliale Progenitorzellen, als potentielle Vermittler des RIPC-Stimulus, beschränke ich mich auf die in der Literatur diskutierten Mechanismen der extrazellulären Signaltransduktion bei der RIPC. Ich möchte jedoch auf das 2013 von Derek J. Hausenloy veröffentlichte Review [39] zu diesem Thema verweisen.

Interessanterweise wurden bereits früh Hinweise auf zweizeitige Effekte der IPC gefunden. Die bis zu diesem Zeitpunkt gezeigten Effekte waren nur kurzweilig und verschwanden nach 1-2 Stunden. [105] Marber *et al.* (1993) beobachteten im Hasenmodell 24 Stunden nach einem IPC-Stimulus zusätzliche protektive Effekte. Sie bezeichneten dieses Phänomen als „second window of protection (SWOP)“. [66] Unabhängig hiervon demonstrierten Kuzuya *et al.* (1993) zeitgleich eine Reduktion der Infarktgröße durch IPC im Hundemodell sowohl direkt nach Verschluss, als auch 24-Stunden später. [56] Sie versäumten allerdings durch Erhebung von Daten in der Zeit zwischen den beiden Zeitpunkten einen möglichen biphasischen Charakter dieses Effektes nachzuweisen. [39] Untersuchungen im weiteren Verlauf unterstützen die Theorie des SWOP. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind jedoch bis heute nicht vollständig geklärt. [39]

Ebenso sind die Mechanismen zur Übertragung der Signale vom ischämisch-präkonditionierten Organ oder Gewebe zum Herzen nicht abschließend geklärt. In der Literatur werden einige Mechanismen diskutiert. Wichtig zu betonen ist jedoch, dass diese Mechanismen vermutlich mit einander interagieren und es sich nicht um einen isolierten Mechanismus handelt. [39]

Der humorale Weg

Die Erkenntnis, dass die alleinige Ischämie eines Organs oder Gewebes ohne anschließende Reperfusion nicht ausreicht, um die Kardioprotektion zu induzieren, legt nahe, dass Botenstoffe über das Blut ausgewaschen werden müssen. [39] Diese Hypothese wird durch ein Experiment von Dickson *et al.* (1999) gestützt, bei dem Blut von präkonditionierten Hasen in unbehandelte Hasen transfundiert wurde. Dies führte bei den unbehandelten Hasen zu einer Reduktion der myokardialen Infarktgröße. [22]

Konstantinov *et al.* (2005) zeigten im Schweinemodell, dass nach Erhalt eines denervierten Schweineherzens der kardioprotektive Effekt der RIPC erhalten blieb. [55] Dies unterstützt die Annahme, dass humorale Faktoren für die Vermittlung des RIPC-Stimulus verantwortlich sind. [39] Shimizu *et al.* (2009) fanden Hinweise darauf, dass die Mechanismen der RIPC auch speziensübergreifend funktionieren, nachdem sie das Plasma von freiwilligen menschlichen Probanden nach vorheriger RIPC in unbehandelte Hasen einbrachten und sich daraufhin ein kardioprotektiver Einfluss bei diesen zeigte. [90] Einige Studien konnten endogene Substanzen identifizieren, welche durch die behandelten Organe in die Blutbahn freigesetzt wurden. Hierzu zählen Adenosin [80], Bradykinin [89], Opioide [76], Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) [100] sowie Endocannabinoide [37]. Diese Substanzen aktivieren im weiteren Verlauf intrazelluläre Mechanismen zur Kardioprotektion. Möglicherweise aktivieren einige Substanzen auch afferente neurale Wege. Der genaue Mechanismus der Signaltransduktion sowie ein spezifischer Botenstoff ist bis heute unbekannt. Mehrere Studien haben vergeblich versucht diesen zu identifizieren. Vermutet wird, dass es sich um eine kleine hydrophobe Substanz handeln könnte. Das Zusammenspiel von humoralen Faktoren mit neuronalen Faktoren ist bis heute ungeklärt. [39]

Der neuronale Weg

Bereits in einer frühen Studie wurden Hinweise auf eine mögliche Beteiligung neuronaler Mechanismen bei der Vermittlung der RIPC gefunden. So konnten Goh *et al.* (1996) zeigen, dass durch Gabe des Ganglionblockers Hexamethonium die kardioprotektive Wirkung der RIPC aufgehoben werden konnte. [33] Gestützt wurde diese Hypothese durch weitere Studien. So konnte der Einfluss von Adenosin [80], Bradykinin [89] und Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) [100] auf die Stimulation afferenter Nerven gezeigt werden. [39] Ding *et al.* (2001) konnten zeigen, dass eine renale Denervation den kardioprotektiven Effekt eines renalen RIPC-Stimulus aufheben konnte. [24] Liem *et al.* (2002) fanden Hinweise darauf, dass Adenosin nach Stimulation des Dünndarms afferente Nervenfasern stimuliert. Zudem fanden sie Hinweise darauf, dass auch die Bildung von Adenosin an kardialen Rezeptoren eine Rolle spielt. [63] Schoemaker und van Heijningen (2000) postulierten, dass auch Bradykinin nach RIPC des Dünndarms zu einer Stimulation afferenter Nerven führen könnte. [89] Wolfrum *et al.* (2002) beobachteten eine Aktivierung der myokardialen ProteinkinaseC (PKC- ϵ) nach vorheriger intestinaler Ischämie. Sie vermuteten, dass diese am Ende des neuronalen Weges stehen könnte. [110] Weitere Studien vermuteten CGRP, einen Neurotransmitter capsaicin-sensitiver Nerven, als weiteren potentiellen Mediator. Diese können wie folgt zusammengefasst werden: RIPC setzt Stickstoff Oxid (NO) frei, welches capsaicin-sensitive Nerven intestinaler Gefäße stimuliert. Daraufhin wird CGRP in die Blutbahn freigesetzt, welches am Herzen die myokardiale PKC- ϵ aktiviert. [39]

Die systemische Antwort

Verschiedene experimentelle Studien haben Hinweise gefunden, dass RIPC zu einer systemischen Reaktion führt. So konnte eine Abschwächung der systemisch-inflammatorischen Reaktion sowie eine Änderungen in der myokardialen Gentranskription gezeigt werden. Das transkribierte Genprofil vermittelte vornehmlich antiinflammatorische sowie antiapoptotische Mechanismen. Die Relevanz dieser Reaktion auf die Kardioprotektion ist aktuell unklar und bedarf weiterer Untersuchung. [39]

1.3 Endotheliale Progenitorzellen

Asahara *et al.* isolierten 1997 Zellen, welche sich *in-vitro* zu Endothelzellen differenzierten und im Tiermodell in Bereichen aktiver Angiogenese ansiedelten. Ihnen gelang somit erstmals die Isolierung von endothelialen Progenitorzellen (EPC). [8] Die Autoren konnten im Weiteren die Herkunft der EPC aus dem Knochenmark [7] und ihre Rolle in der postnatalen Neovaskularisation [9] zeigen.

Die Entdeckung dieser Zellen hat das damalige Verständnis der adulten Neovaskularisation, insbesondere in ischämischem Gewebe, radikal verändert. Die zugrunde liegenden Mechanismen werden bis heute kontrovers diskutiert. Auch die genaue Herkunft dieser Zellen ist nicht vollständig geklärt, so wurden Hinweise darauf gefunden, dass die Herkunft EPC nicht ausschließlich auf das Knochenmark begrenzt ist. Unabhängig von diesen Unklarheiten spielen EPC eine wichtige Rolle in der Neovaskularisation ischämischer Gewebe. [5]

1.3.1 Klinische Bedeutung

Klinisch zeigt sich ein positiver Einfluss von EPC auf das kardiovaskuläre Risiko. So fanden Hill *et al.* (2003) Hinweise darauf, dass eine hohe Anzahl EPC mit einem geringeren kardiovaskulären Risiko assoziiert sein könnte. [45] Werner *et al.* (2005) fanden später eine inverse Korrelation der Anzahl frei zirkulierender EPC mit dem Risiko, an kardialen Todesursachen zu sterben. [107] Heute gelten EPC als Prädiktoren für Morbidität und Mortalität bei kardiovaskulär vorerkrankten Patienten. [107]

Der therapeutische Einsatz von EPC wurde in den letzten Jahren durch unterschiedliche Arbeitsgruppen untersucht. Bereits 2003 führten Stamm *et al.* eine therapeutische Transplantation von CD133+ Knochenmarksstammzellen durch. [92] Diese Zellen stellen eine Subpopulation der nativen, nicht kultivierten EPC im Knochenmark dar. [5] Die Autoren beobachteten bei ihrer Untersuchung, dass die linksventrikuläre Funktion sich im Verlauf bei vier von sechs Patienten verbesserte, des Weiteren war bei fünf Patienten eine Verbesserung der Perfusion des Infarktareals auffällig. [92] Weitere Autoren führten ähnliche Untersuchungen durch. Die meisten dieser Studien postulierten die Effektivität der Transplantation von EPC als Therapieoption bei der Behandlung der ischämischen Herzerkrankung. [5]

Diese Ergebnisse werden gestützt durch verschiedene tierexperimentelle Studien. So konnten Ma *et al.* (2006) im Mausmodell eine Steigerung der kardialen Kontraktilität nach Injektion von CD133+ Zellen aus dem Knochenmark in eine Infarktzone zeigen. [65] Andere Autoren konnten positive Effekte auf die linksventrikuläre Funktion, die Infarktzonengröße, das ventrikuläre Remodeling und die Neovaskularisation zeigen. [5]

1.3.2 Mobilisation

Die Mobilisation der EPC stellt eine natürliche Reaktion auf eine Gewebeischämie dar. [98] So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Anzahl zirkulierender EPC nach myokardialer Ischämie [60] sowie nach kardiochirurgischen Eingriffen [85] steigt.

Vermittelt wird dieser Prozess vornehmlich durch Chemokine wie den granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) [13], den granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) [98], den stromal derived factor-1 (SDF-1) [113] sowie durch Zytokine wie den vascular endothelial growth factor (VEGF) [98]. Zudem können EPC durch Hormone wie Erythropoietin [43] oder Östrogen [96] mobilisiert werden. Auch Pharmaka aus der Gruppe der Statine [23] weisen einen solchen Effekt auf. [73]

1.3.3 Identifikation

Die Identifikation von EPC ist anhand charakteristischer Marker in der Durchflusszytometrie möglich.

Der wichtigste Stammzellmarker zur Identifizierung von hämatopoetischen Stammzellen ist das CD34-Antigen, ein Oberflächenglykoprotein [91, 16]. Eine gängige Methode ist die durchflusszytometrische Identifizierung mittels des ISHAGE-Verfahrens [97]. Die Identifizierung endothelialer Progenitorzellen ist jedoch durch die alleinige Analyse von CD34 nicht möglich, da dieses Protein auch von anderen Subpopulationen hämatopoetischer Stammzellen getragen wird. Es werden folglich weitere Marker benötigt. [67]

Ein solcher Marker zur Identifikation endothelialer Progenitorzellen (EPC) ist CD133 (Syn.: AC133, prominin-1). [32] Es handelt sich hierbei um ein Transmembranglykoprotein, dessen genaue Funktion unbekannt ist. [47] Er gilt jedoch als Marker für Hämangioblasten, eine besonders frühe Form hämatopoetischer Stammzellen, welche das Potential zur endothelialen Differenzierung aufweisen. [84] Im Verlauf verlieren die EPC diesen Marker jedoch wieder, so dass eine Aussage über den Entwicklungsgrad möglich ist. [78]

Eine weitere wichtige Rolle bei der Identifizierung und Mobilisation EPC spielt die membranständige Tyrosinkinase CD117 (Syn.: KIT, c-Kit, SCFR). [21] Diese findet sich vornehmlich auf bestimmten hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark und spielt demnach auch in anderen Zelllinien, als den EPC sowie auf Krebszellen, eine Rolle. [27]

Bei CD184 (Syn.: CXCR4, Fusin, LESTR) handelt es sich um einen SDF-1-Rezeptor, welcher unter anderem von CD34+ Stammzellen exprimiert wird [70] und bei der Migration selbiger eine wichtige Rolle spielt. [79, 1] Er kommt zudem auf den meisten hämatopoetischen (Stamm-)Zellen, auf Mono- [15], Granulo- [17] und Lymphozyten [71] sowie auf vaskulären Endothel-, verschiedenen Nerven- und Tumorzellen vor. [71]

Auch der „Kinase insert domain receptor“ (Syn.: KDR, CD309, VEGFR-2, FLK1) kann bei der Identifikation EPC hilfreich sein. [107] Dieser Rezeptor wirkt bei der endothelialen Gefäßregulation mit. [46] Er kann bei allen EPC-Entwicklungsstufen, inklusive fertig differenzierter Endothelzellen gefunden werden. [6]

Neben Antikörper-basierten Methoden ist eine Identifizierung auch über eine Bildung von charakteristischen Kolonien in einer speziellen Zellkultur möglich. [45]

1.4 Zielsetzung

Die der ischämischen Remote-Präkonditionierung (RIPC) zugrunde liegenden Mechanismen konnten bis heute nicht vollständig geklärt werden. [42] Bekannt ist, dass sowohl die RIPC [42] als auch die Transplantation endothelialer Progenitorzellen (EPC) [5] positive Effekte auf die Regeneration ischämisch geschädigter Myokardareale aufweisen. Außerdem ist bekannt, dass es zu einer vermehrten Mobilisierung von EPC nach Myokardischämie kommt. [60, 85] Der Annahme folgend, dass diese Mechanismen der RIPC multifaktoriell sind [39] und da der Einfluss auf endotheliale Progenitorzellen zu Beginn dieser Arbeit meines Wissens nach noch nicht untersucht wurde, soll diese Arbeit zur Klärung beitragen.

Zu diesem Zweck wurde bei Probanden, welche sich einer elektiven herzchirurgischen Operation, unter Verwendung einer Herz-Lungen-Maschine unterzogen, präoperativ nach doppelt verblindeter Randomisierung, eine bzw. keine ischämischen Präkonditionierung durchgeführt. Blutproben dieser Probanden wurden zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen und mittels Durchflusszytometrie und Zellkultur auf Konzentrationsänderungen von EPC untersucht. Im Falle der Durchflusszytometrie wurde eine auf dem häufig verwendeten ISHAGE-Protokoll [97] basierende Gatingstrategie [58] gewählt, welche die Expression von CD34+, CD117+, CD133+, CD184+ sowie verschiedene Kombinationen dieser Marker zur Identifikation von EPC nutzt. Bei der Zellkultur wurde ein kommerziell erhältliches Selektivmedium genutzt.

2 Material und Methoden

2.1 Hardware

- Axiovert 40 CFL, Mikroskop, Carl Zeiss (Jena)
- BD LSR II, Durchflusszytometer, BD Biosciences (Heidelberg)
- CB150, Inkubator (37°C, 5% CO₂), Binder GmbH (Tuttlingen)
- Eppendorf 5417R, Zentrifuge, Eppendorf AG (Hamburg)
- Heraeus BDD 6220, Inkubator (37°C, 5% CO₂), Thermo Scientific (Waltham MA, USA)
- Multifuge 1 S-R, Zentrifuge, Heraeus Holding GmbH (Hanau)
- Pipetboy acu, Integra Biosciences (Fernwald)
- Safeflow 1.2.Nunc™, Sterilbank, Nunc GmbH & Co KG (Langenselbold)
- Scotsman AF 30, Eismaschine, Scotsman® Ice Systems (Milan, Italien)
- Systec V-150, Autoklav, Systec GmbH (Wettenberg)
- Vortex-Genie 2, Scientific Industries (Bohemia, USA)
- W6, Wasserbad, Funke Medingen (Freital)

2.2 Software

- Citavi® 4 / 5, Swiss Academic Software (Wädenswil, Schweiz)
- Excel® 2013, Microsoft Corporation (Redmond, USA)
- FACSDiva™ Software, BD Biosciences (Heidelberg)
- Google Scholar, Google Inc. (Mountain View, USA)
- PubMed, National Center for Biotechnology Information (Bethesda, USA)
- Scopus®, Elsevier (Amsterdam, Niederlande)
- SPSS® Statistics Version 20.0, IBM Corporation (Armonk, USA)
- Word® 2013, Microsoft Corporation (Redmond, USA)

2.3 Verbrauchsmaterialien

- BioCoat™ Fibronectin Cellware, 24 well plates, BD (Kingston/Ontario, Kanada)
- BioCoat™ Fibronectin Cellware, 35mm petri dishes, BD (Kingston/Ontario, Kanada)
- CELLSTAR® Tubes (15ml, 50ml), Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
- Eppendorf® Pipetten (1000µl, 200µl, 100µl, 10µl, 2,5µl), Eppendorf AG (Hamburg)
- Eppendorf® Tubes (0,5ml, 1,5ml, 2ml), safe lock, nonsterile, Eppendorf AG (Hamburg)
- Pipettenspitzen 1000µl blau, 200µl gelb, Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
- Pipettenspitzen 10µl neutral, Sarstedt AG & Co (Nümbrecht)
- Serologische Pipetten (10ml, 25ml), Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
- S-Monovette® EDTA (7,5ml), Sarstedt AG & Co (Nümbrecht)
- Sterling nitrile powder-free exam gloves, latex-free, Kimberly-Clark (Mainz)

2.4 Lösungen und Reagenzien

- BD FACSTFlow™ Sheath Fluid, Kat. 342003, BD (Kingston/Ontario, Kanada)
- BD Horizon™ V450 Mouse Anti-Human CD14, Kat. 560349, BD (Kingston/Ontario, Kanada)
- BD Horizon™ V500 Mouse Anti-Human CD45, Kat. 560777, BD (Kingston/Ontario, Kanada)
- BD Pharmingen™, CD184, Kat. 555975, BD (Kingston/Ontario, Kanada)
- CD117, Kat. 339217, BD (Kingston/Ontario, Kanada)
- CD133 antibodies, human, Kat. 130-090-085, Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
- CD309 antibodies, human, Kat. 130-093-061, Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
- CD34 antibodies, human, Kat. 130-081-001, Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
- CFU Hill Liquid Medium Kit, Kat. 05900, STEMCELL Technologies, (Vancouver, Kanada)
- Ethanol 70% denaturiert mit Ethylmethyleketon, 1000ml, Apomix (Halle/Saale)
- Giemsa Lösung, Kat. 32884, Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
- LIVE/DEAD® Near-IR, Kat. L10119, Life Technologies (Carlsbad/CA, USA)
- LSM 1077, Kat. J15 004, PAA Laboratories (Pasching, Österreich)
- MACS-Puffer mit 0,5% bovinem Serumalbumin, Kat. A7906, Sigma Aldrich (St. Louis, USA)
- Methylenblau / Essigsäure (3%), Kat. 07060, STEMCELL Technologies (Vancouver, Kanada)
- PBS (ohne Ca²⁺ und Mg²⁺), Kat. P04 362500, PAN Biotech (Aidenbach)
- PBS/EDTA, Endkonzentration 2mM EDTA, FKGO (Rostock)
- UltraPure™ 0.5M EDTA, pH 8.0, Kat. 15575 038, Life Technologies (Carlsbad/CA, USA)

2.5 Patientenrekrutierung

Diese Arbeit wurde in Kooperation mit der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie der Universitätsmedizin Rostock durchgeführt. Die Patientenrekrutierung geschah aus dem Patientenkollektiv der dort durchgeführten RIPHeart-Studie. Der Rekrutierungszeitraum erstreckte sich von März 2011 bis Februar 2014.

2.6 RIPHeart – Studie

Das Studiendesign der RIPHeart-Studie wurde 2012 von Meybohm *et al.* publiziert [69] und wird im Folgenden, auf die für diese Arbeit relevanten Teile beschränkt und um Details ergänzt, wiedergegeben.

Die RIPHeart-Studie ist eine prospektive, randomisierte, doppelblinde, multizentrische, kontrollierte, klinische Studie. Untersucht wurde der Einfluss einer ischämischen Fern- (Remote-) Präkonditionierung (RIPC) von elektiv herzchirurgisch operierten Erwachsenen.

Eingeschlossen wurden Erwachsene (≥18 Jahre), nach schriftlicher Einverständniserklärung, welche für sämtliche herzchirurgische Operationen, unter Nutzung eines kardio-pulmonalen Bypasses, geplant waren. Die Ausschlussfaktoren wurden in drei Gruppen aufgeteilt und sind in Tabelle 2.6.1 aufgelistet.

Chirurgisch bedingte Faktoren	Herz bedingte Faktoren	Andere Faktoren
“off-pump”-Verfahren zeitgleiche Carotis-OP minimal-invasive Chirurgie selektive antegrade Hirnperfusion, vorherige Herzoperation Aorta descendens Chirurgie	frischer Myokardinfarkt (<7 Tage) Ejektionsfraktion <30% Vorhofflimmern (<6 Monate) Antiarrhythmika Therapie Implantierter Herzschrittmacher Implantierter Defibrillator instabile Angina pectoris	Apoplex (<2 Monate) schweres Nierenversagen schweres Leberversagen schwerer Alkoholabusus schwere COPD Therapie mit Sulfonylharnstoffen/Nicorandil akute Infektion mit Antibiotikatherapie schwere pAVK (Fontaine 3/4) schwere neurologische Erkrankungen Heparin-induzierte Thrombozytopenie Typ II

Tabelle 2.6.1 Ausschlussfaktoren zur Aufnahme in die RIPHeart-Studie

Bei allen Patienten wurde als Narkoseform eine total intravenöse Anästhesie gewählt. Weiterhin wurde ein nicht-pulsatiler kardiopulmonaler Bypass verwendet, bei dessen Anwendung bestimmte Parameter wie folgt standardisiert wurden: Mittlerer arterieller Blutdruck (60-70 mmHg), Hämatokrit (0,25-0,3), Blutzucker (<200mg/dl), Verwendung von Filtern in der arteriellen Linie sowie Regulierung des Kohlendioxidpartialdruckes.

Die Patienten wurden durch das Studienzentrum Leipzig der Therapie- oder Kontrollgruppe zugeteilt. Die Randomisierung geschah geschichtet nach Zentrum und individuellem perioperativem Mortalitätsrisiko des Patienten, für dessen Erfassung das Europäische System für herzchirurgische Risikobewertung (EuroSCORE) verwendet wurde. Es wurde ein cut-off-Wert von 5% für die vorhergesagte Mortalität genutzt, um Patienten als Hochrisikopatienten einzustufen. Für die Berechnung wurde eine Online-Checkliste für individuelle Risikofaktoren, zum Zeitpunkt der Registrierung, genutzt.

Die Verblindung umfasste den Patienten, das in die Operation involvierte Personal (Anästhesie und Herzchirurgie), das Personal der (Intensiv-)Pflegestationen sowie Personen, welche im weiteren Verlauf an der Erfassung von Daten beteiligt waren. Vor Beginn der Operation befestigte man je eine Blutdruckmanschette an dem Oberarm des Patienten und an einem Dummyarm, welche je nach Zuweisung des Patienten in die Therapie- oder Kontrollgruppe, durch nicht verblindetes Personal bedient wurden. In vier Zyklen wurde die Blutdruckmanschette für fünf Minuten auf 200 mmHg, jedoch mindestens 15 mmHg höher als der systolische Blutdruck, aufgepumpt und anschließend für fünf Minuten entlastet.

Die eigentliche ischämische Phase wurde durch die intraoperative Umgehung des koronaren Systems mittels Herz-Lungen-Maschine dargestellt.

Das Studienprotokoll, die Patientenaufklärung sowie die Einwilligungserklärung wurden durch das Ethikkomitee der Universität Kiel sowie durch das Ethikkomitee der Universität Rostock genehmigt. Jeder Patient musste seiner Teilnahme an der Studie schriftlich zustimmen. Die Datenerfassung erfolgte unter Verwendung eines Pseudonyms.

2.7 Untersuchungszeitpunkte

Den Patienten wurde vor Durchführung der Studientherapie sowie 6h (± 1 h), 48h (± 1 h) nach Ende der Operation („Nahtzeit“) sowie am 6. postoperativen Tag, Blut abgenommen. Zu jedem Untersuchungszeitpunkt wurde den Patienten ca. 22,5 ml Blut (3x S-Monovette® EDTA a 7,5 ml) durch qualifiziertes Personal abgenommen. Dieses Blut diente als Ausgangsmaterial für die weiteren Analysen.

2.8 Zellisolation

Ausgangsmaterial für die Zellisolation war frisches EDTA-Blut. Dieses wurde durchgehend unter sterilen Bedingungen, das heißt in einer Sterilbank, unter Verwendung von sterilen Materialien und mit Ethanol (70 %) sprüh- und wischdesinfizierten Werkzeugen und Handschuhen, verarbeitet. Primär nicht sterile Materialien wurden, vor der Verwendung durch Mitarbeiter des Labors, sterilisiert. Bei der Aufbereitung der Proben unterstützten mich zeitweise Mitarbeiter des Labors.

Zunächst wurde das Blut in den Abnehmeröhrchen zehnmal langsam invertiert, um eine gute Durchmischung des EDTA-Blutes zu erreichen. Anschließend wurde das EDTA-Blut mittels serologischer Pipette (10ml) in ein 50 ml CELLSTAR®-Tube verbracht. Die Menge des EDTA-Blutes wurde als Ausgangswert für die Zellisolation notiert. Im Anschluss wurde das Restblut zweimal mit je 2ml PBS/EDTA aus den EDTA-Probenröhrchen gewaschen. Zwischenzeitlich wurde ein 50 ml Leucosep™-Tube mit 17,5 ml LSM befüllt, kurz bei 1000 g zentrifugiert und anschließend der Überstand verworfen. Das EDTA-Blut wurde nun mittels 25ml PipetBoy-Pipette vorsichtig und langsam aus dem CELLSTAR®-Tube in das Leucosep™-Tube überführt. Auch das CELLSTAR®-Tube wurde zweimal mit je 2ml PBS/EDTA gewaschen und das Restblut in das Leucosep™-Tube überführt. Es folgte die Zentrifugation des EDTA-Blutes im Leucosep™-Tube für 40 Minuten bei 400 g. Bei der Einstellung der Zentrifuge war weiter darauf zu achten, dass eine geringe Beschleunigungsstärke gewählt und die Bremse ausgeschaltet wurde. Im Anschluss wurde die nun sichtbare Zellschicht mittels einer Pasteurpipette in ein frisches 50 ml CELLSTAR®-Tube überführt und bei 300 g für 10 Minuten zentrifugiert. Der so entstandene Überstand wurde verworfen und die Zellen in etwa 600 µl PBS resuspendiert. Es folgte die Zellkonzentrationsbestimmung mittels Neubauer®-Zählkammer. Die Zellen standen nach diesem Schritt zur weiteren Nutzung zur Verfügung.

2.9 Zellzählung

Zur Bestimmung der Zellkonzentration wurden der zuvor isolierten Zellsuspension 10 µl entnommen und in einem 0,5 ml Eppendorfgefäß mit 90 µl PBS verdünnt. Hiervon wurden wiederum 10 µl entnommen und in einem weiteren 0,5 ml Eppendorfgefäß mit 10 µl Methylenblau/Essigsäure (3 %) gefärbt. Es wurden 10 µl dieser Suspension in die vorbereitete Neubauer®-Zählkammer überführt und unter dem Mikroskop gezählt. Die so ermittelte Zellzahl, Zellkonzentration sowie das Volumen der Probe wurden notiert.

2.10 Durchflussszytometrie

2.10.1 Probenvorbereitung für die Durchflussszytometrie

Aus der zuvor durchgeführten Zellisolierung konnten die gewonnenen Zellen für die FACS-Analyse genutzt werden. Die Verarbeitung der Zellen unter sterilen Kautelen war nicht erforderlich. Es wurde jedoch darauf geachtet, dass die Temperatur, während der Verarbeitung der Proben, bei etwa 4°C lag und unnötige Lichtexposition vermieden wurde. Hierzu wurden vorgekühlte Substanzen verwendet und auf Eis gearbeitet.

Zunächst wurde ein EPC-Mastermix hergestellt. Hierzu wurden die einzelnen Antikörper nach dem Schema der Tabelle 2.10.1 gemischt. Der EPC-Mastermix wurde bis zu 48 Stunden bei 4°C im Kühlschrank gelagert und konnte so für weitere Zeitpunkte genutzt werden.

Die Färbung der Zellen für die FACS-Analyse geschah direkt im Anschluss an die Zellisolierung. Zunächst wurden zwei 1,5 ml Eppendorfgefäße bereitgestellt und mit „EPC“ bzw. „control“ sowie Daten zur eindeutigen Identifizierung der Probe, beschriftet. Es wurden anschließend je 2×10^6 Zellen in die vorbereiteten Eppendorfgefäße verbracht. Die „control“-Probe wurde erst mit MACS auf 180 µl aufgefüllt, anschließend wurden 20 µl FcR-Block hinzugegeben. Zu der „EPC“-Probe wurden, nach auffüllen der Probe mit MACS auf ein Volumen von 104 µl, 20 µl FcR-Block sowie 76 µl EPC-Mastermix hinzugefügt. Die Berechnung der Volumenanteile der Zellsuspension und des MACS-Puffers wurden durch eine Excel-Tabelle, auf Grundlage der in der Zellzählung ermittelten Zellkonzentration durchgeführt. Beide Proben wurden nun für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Im Anschluss wurden beiden Proben 950 µl PBS hinzugefügt und diese dann in einer auf 4°C vorgekühlten Zentrifuge bei 300 g für 10 Minuten zentrifugiert. Zum Schluss wurden die Proben fixiert. Hierzu wurde der flüssige Überstand verworfen und die Zellen mit 150 µl PBS resuspendiert, anschließend wurden 100 µl PFA-Stock hinzugefügt und die jeweilige Probe sofort mittels Vortex auf niedriger Stufe vermengt. Abschließend wurde 15 µl 20%iges NaN_3 hinzugefügt. Die Proben wurden nun bis zur Analyse, jedoch maximal sieben Tage, bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Antikörper	Konjugate	V_{AB} [μ l]	$2 \times V_{AB}$ [μ l]	$3 \times V_{AB}$ [μ l]	$4 \times V_{AB}$ [μ l]
CD34	FITC	10	24	36	48
CD133	PE	10	24	36	48
CD184	PE-Cy5	20	48	72	96
CD117	PE-Cy7	5	12	18	24
CD309	APC	10	24	36	48
NearIR	APC-Cy7	1	2,4	3,6	4,8
CD14	Pacific blue (V450)	10	24	36	48
CD45	AM Cyan (V500)	10	24	36	48

Tabelle 2.10.1 Volumina der unterschiedlichen Antikörper-Floureszenzfarbstoffe zur Herstellung eines Mastermix nach Nutzungsportionen

2.10.2 Durchführung der Durchflusszytometrie

Die Analyse wurde, nach den Vorgaben des Herstellers durch erfahrene Mitarbeiter des Labors sowie nach eingehender Unterweisung auch selbstständig, durchgeführt. Die ermittelten Rohdaten wurden zur weiteren Auswertung gesichert.

2.10.3 Auswertung

Für die weitere Analyse der so gewonnen Daten wurde eine auf dem ISHAGE-System [97] basierende Gating-Strategie gewählt, welche von Mitarbeitern unseres Labors für die entsprechenden Zellen etabliert und publiziert [58] worden ist.

Zum Ausgleich etwaiger aus der Mehrfachfärbung entstandener Interferenzen wurden für alle verwendeten Farbstoffe Einzel-Bead Messungen durchgeführt. Anschließend wurde eine entsprechende Kompensation durch die FACSDiva™-Software berechnet, welche für die weiteren Analysen der Einzelproben berücksichtigt wurde. Zur Justierung der genutzten Gates sowie zur Qualitätskontrolle, wurden bei mehreren Proben FMO-Kontrollen durchgeführt.

Für die Analyse der Daten wurden zunächst Debris über die forward-/sideward-Scatter Einstellungen ausgeschlossen. Anschließend wurden die lebenden Zellen definiert. Diese wurden sodann zur Quantifizierung CD34+ Stammzellen mittels der ISHAGE-Kriterien [97] herangezogen. In angepassten mehrstufigen Verfahren wurden analog hierzu CD117+ sowie CD133+ Stammzellen identifiziert. Die so ermittelten Zellpopulationen wurden weiterhin auf verschiedene Varianten einer Koexpression von CD34+, CD117+, CD133+, CD309+ oder CD184+ hin untersucht. Wie auch schon bei Laupheimer *et al.* (2014) [58] konnte keine Koexpression von CD309+ gezeigt werden. Somit konnte dieser Marker für weitere Analysen nicht genutzt werden. Ergänzend wurden CD184+ PBMC und CD14+ Monozyten identifiziert.

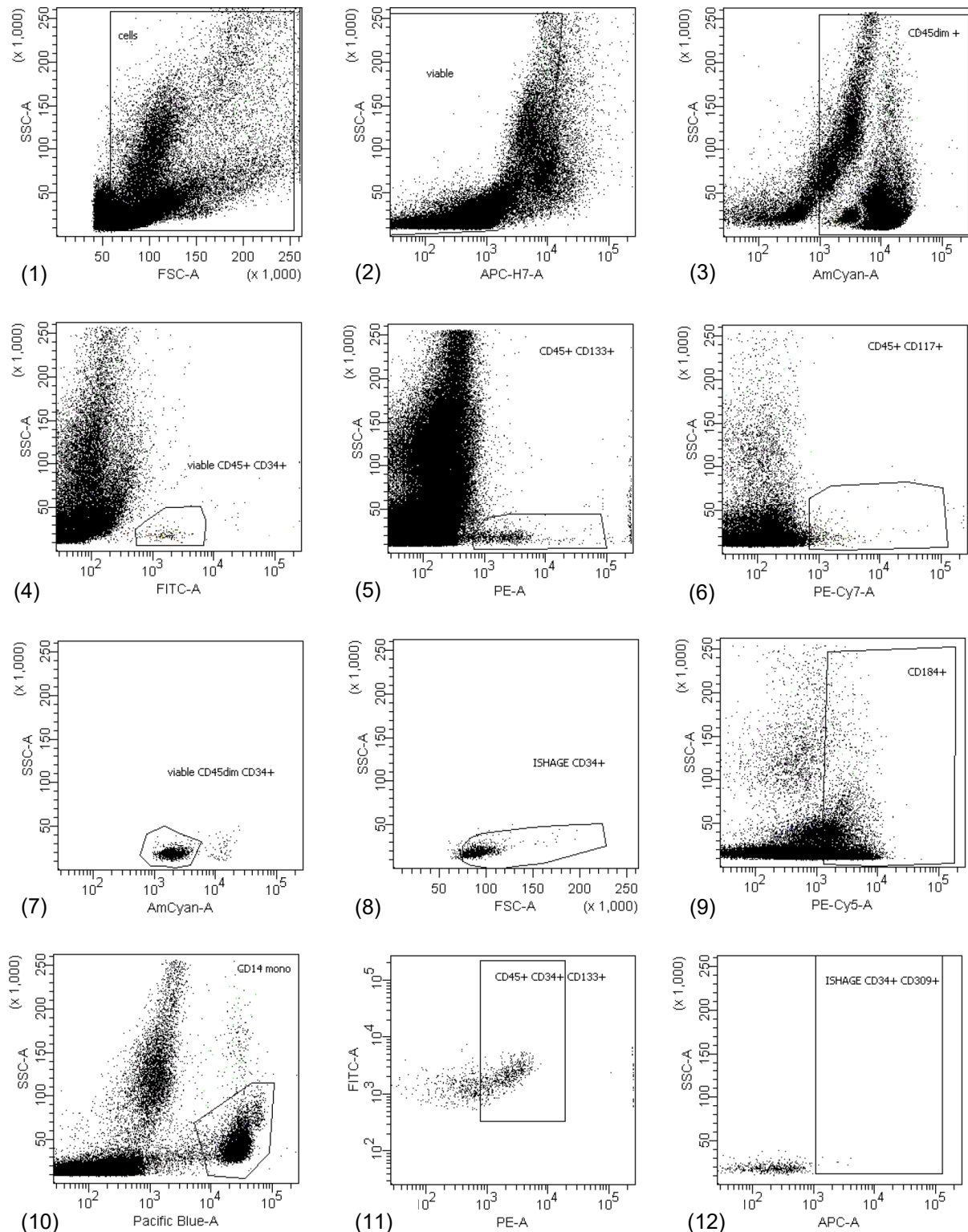


Abbildung 2.1 Gatingstrategie

Nach initialem Ausschluss von Debris durch Größe und Granularität (1) wurden die vitalen Zellen definiert (2). Eine Identifikation von Leukozyten anhand ihrer CD45-Expression (3) sowie von CD34+ hämatopoetischen Stammzellen anhand der ISHAGE-Kriterien (4) wurde durchgeführt. Für CD133+ (5) und CD117+ (6) wurden adaptierte Verfahren genutzt. Zur Vermeidung der Ergebnisverfälschung durch falschpositive Lymphozyten wurde nach Identifikation der Stammzellen jene Subpopulation gewählt, welche nur schwach CD45 exprimiert (7). Abschließend wurde die Morphologie der Zellen in einem Backgating geprüft (8). Basierend hierauf wurden weitere Subpopulationen ermittelt. CD184+ Zellen (9) sowie CD14+ Monozyten (10) wurden ohne Backgating auf Basis lebender Leukozyten ermittelt. Analog zu den vorgenannten Populationen wurde die Kombination CD34+/CD133+ einem separaten ISHAGE-Backgating unterworfen (11). Für CD309+ konnte keine Koexpression gezeigt werden, so dass dieser Marker für weitere Analysen nicht herangezogen wurde (12).

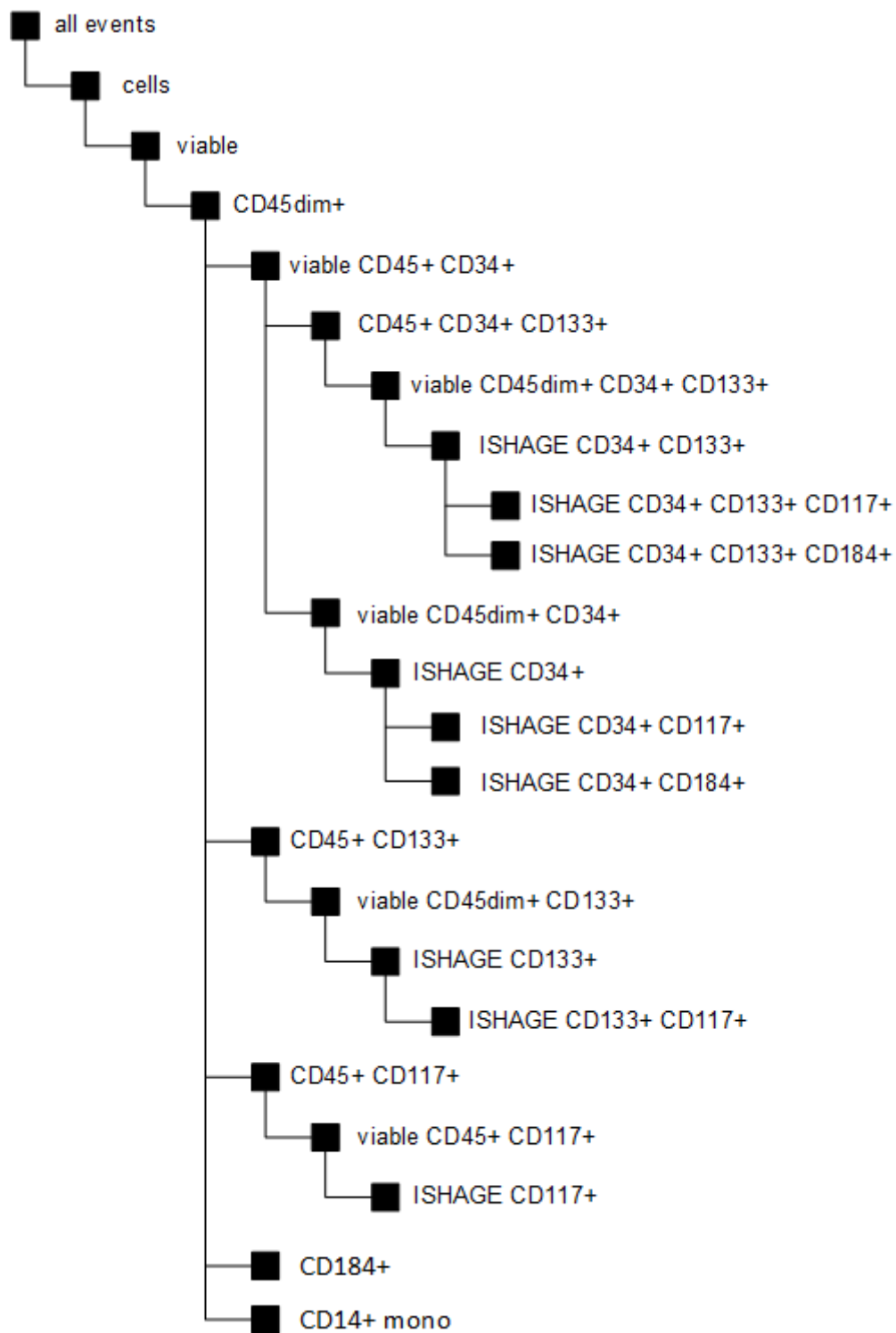


Abbildung 2.2 Gatingstrategie
Darstellung der Gatingstufen zur Identifikation der untersuchten Subpopulationen

2.11 CFU-Hill

Im Jahre 2003 publizierte Hill *et al.* eine Methode zur Identifizierung endothelialer Progenitorzellen (EPC) mittels Zellkultur. [45] Sie kultivierten mononukleare Zellen aus peripherem Blut (PBMC) in einem Selektivmedium und identifizierten die EPC an Hand einer charakteristischen Morphologie der Kolonien. Es imponierten runde Zellen umgeben von radiär angeordneten spindelförmigen Zellen. Diese Methode stellt eine Alternative zu den Analysen mittels Identifizierung spezifischer Oberflächenantigene dar. In der Zwischenzeit steht mit „CFU-Hill Liquid Medium Kit (Human)“ der Firma „STEMCELL Technologies“ ein kommerzielle vertriebenes Set zur Durchführung dieser Analyse zur Verfügung.

2.11.1 Durchführung

Ausgangsmaterial waren Zellen aus der Zellisolierung. Für das CFU-Hill Colony Assay wurde das bereits genannte Set der Firma STEMCELL Technologies verwendet. Das Testmedium wurde gemäß der Anleitung des Herstellers vorbereitet und in mehreren 2 ml Eppendorfgefäße bei -21°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die Verarbeitung der Zellen geschah, wie bei der Zellisolierung, unter sterilen Bedingungen.

Im Anschluss an die Zellisolierung wurden drei 1,5 ml Eppendorfgefäße mit je 5×10^6 Zellen befüllt und mittels 500 ml PBS verdünnt. Die so entstandene Zellsuspension wurde bei 300 g für 10 Minuten zentrifugiert. Zwischenzeitlich wurden drei 2 ml Eppendorfgefäße mit dem vorbereiteten CFU-Hill-Medium auf 37°C vorgewärmt. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, die Zellen mit je 80 µl CFU-Hill-Medium resuspendiert und in die 2 ml Eppendorfgefäße mit CFU-Hill-Medium überführt. Der Inhalt wurde, nach Durchmischung der Suspensionen, in je eine Fibronectin-beschichtete 35mm Petrischale verbracht. Alle drei Proben wurden bei 37°C und 5 % CO₂ für zwei Tage inkubiert.

Nach der zweitägigen Inkubationszeit wurden die nicht adhärenen Zellen in eine Fibronectin-beschichtete 24-well-Platte umgesetzt. Hierbei wurde wiederum eine Zellzählung mittels Neubauerzählkammer unter Methylenblau-Färbung durchgeführt. Es wurden den bisherigen Ansätzen je zweimal 1×10^6 Zellen entnommen und diese in je ein Well pipetiert. Überschüssige Zellen wurden verworfen. Die ausgesäten Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO₂ für weitere drei Tage inkubiert.

Hiernach wurden die Zellen fixiert. Es wurde zunächst das überschüssige Nährmedium abpipetiert und die Zellen für 5 Minuten mit jeweils 500 µl Methanol (100 %) behandelt. Nach der Lufttrocknung wurden die Zellen zur besseren Auswertbarkeit mittels Gimsa gefärbt. Hierzu wurden in jedes Well für 5 Minuten 500 µl Giemsa-Lösung gegeben und anschließend diese mehrfach mit Aqua dest ausgewaschen.

2.11.2 Auswertung

Die lichtmikroskopische Auswertung der 24-well-Platten wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Hier wurde nach Kolonien gesucht, welche eine typische Morphologie aufwiesen. Sie imponierten mit zentral liegenden runden Zellen und radiär angeordneten spindelförmigen Zellen. Es wurde weiterhin darauf geachtet, dass für jeden Patient die Auswertung der jeweiligen Zeitpunkte von dem gleichen Untersucher durchgeführt wurde.

2.12 Statistik

2.12.1 Normierung der erhobenen Werte

Um eine relative Verfälschung der Ergebnisse durch Konzentrationsänderungen anderer Zellpopulationen zu minimieren, wurden die erhobenen Werte auf das Blutvolumen bezogen [ml⁻¹].

Zunächst wurde unter Zuhilfenahme von Excel die Konzentration isolierter Zellen pro ml Blut [ml⁻¹] ermittelt. Dies geschah anhand folgender Formel mit zuvor dokumentierten Daten:

$$\text{Zellen pro ml Blut [ml}^{-1}\text{]} = \frac{\text{Zellkonzentration der Probe [ml}^{-1}\text{]} \times \text{Volumen der Probe [ml]}}{\text{Verwendetes Blutvolumen [ml]}}$$

Der so ermittelte Wert wurde für die FACS-Analyse mit der durchflusszytometrisch ermittelten Zahl der Zellen verrechnet, um so einen Korrekturfaktor für die übrigen Werte zu erhalten:

$$\text{untersuchtes Blutvolumen [ml]} = \frac{\text{Anzahl untersuchter Zellen}}{\text{Zellen pro ml Blut [ml}^{-1}\text{]}}$$

Dieser Korrekturfaktor wurde schließlich mit den Einzelwerten aus den Rohdaten multipliziert, um diese auf das Blutvolumen zu normieren:

$$\text{Konzentration der Zellpopulation [ml}^{-1}\text{]} = \frac{\text{gemessene Zellpopulation}}{\text{untersuchtes Blutvolumen [ml]}}$$

Für die Analyse der CFU-Hill-Zellkultur wurde abweichend hiervon:

$$\text{Kolonien pro ml Blut [ml}^{-1}\text{]} = \text{Kolonien pro mio Zellen [x10}^{-6}\text{]} \times \text{mio Zellen pro ml Blut [x10}^6\text{/ml]}$$

2.12.2 Statistische Aufarbeitung der Daten

Die somit aufbereiteten Daten wurden anschließend aus Excel in SPSS transferiert und analysiert.

Primär wurden die verfügbaren Daten deskriptiv (Anzahl, Mittelwert, Median, Standardabweichung, Minimal- und Maximalwert) bezüglich der Merkmale Patientenalter, Geschlecht, Gruppenzugehörigkeit, durchgeführter Eingriff und Ejektionsfraktion analysiert.

Weiter wurden die präoperativen Werte auf Normalverteilung (Test nach Shapiro-Wilk) und signifikante Unterschiede (t-Test bei Normalverteilung, U-Test nach Mann-Whitney ohne Normalverteilung) zwischen Therapie- und Kontrollgruppe getestet. Unterschiede sollten hierbei nicht auftreten, da noch keine Therapie durchgeführt wurde.

Da eine Änderung von Messwerten im zeitlichen Verlauf (abhängige Variable) im Vergleich zwischen Therapie- und Kontrollgruppe (unabhängige Variable) untersucht werden sollte, wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholung (ANOVA) durchgeführt. Hierzu konnten jedoch nur vollständige Datensätze herangezogen werden, so dass unvollständige Datensätze ausgeschlossen wurden. Im Rahmen dieser Analyse wurde zudem auf Varianzhomogenität (Levene-Test) und Sphärizität (Mauchly-Test) getestet. Bei nicht gegebener Sphärizität wurde eine Korrektur durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Studienpopulation

Primär wurden 50 Probanden in die Studie eingeschlossen. Der Rekrutierungszeitraum erstreckte sich von März 2011 bis Februar 2014. Während der Laufzeit der Studie verstarb ein Proband an postoperativen Komplikationen. Zwei Fälle wurden aus organisatorischen Gründen nur für eine Begleituntersuchung verarbeitet, bei der auf eine Zellisolation verzichtet wurde. Drei weitere Fälle waren aufgrund technischer Fehler nicht auswertbar. Somit standen 44 Probanden für die Untersuchung zur Verfügung.

In dieser Population gehörten 23 Probanden der Kontrollgruppe und 21 Probanden der Therapiegruppe an. 34 Probanden waren männlich, 10 weiblich. Im Durchschnitt waren sie 65,1 Jahre (SD: 9,8) alt, wobei der jüngste Proband 46 Jahre und der älteste Proband 78 Jahre alt war. Es wurde bei 23 Patienten ein aortocoronarer Bypass (ACB), bei 9 Patienten ein ACB in Kombination mit einem weiteren Eingriff und bei 12 Patienten ein anderer herzchirurgischer Eingriff durchgeführt. Die präoperativ erhobene Ejektionsfraktion als Maß der Herzleistung lag in Durchschnitt bei 58,2 % (SD: 7,9).

3.2 Durchflusszytometrie (FACS)

Die Anzahl der auswertbaren Fälle wurde durch eine methodische Besonderheit der ANOVA limitiert. Diese kann, wie bereits gezeigt nur Fälle auswerten, welche über alle Zeitpunkte Werte liefern, so dass Fälle, bei denen einzelne Zeitpunkte ausgefallen sind, nicht in die Analyse miteinbezogen werden konnten.

Weiter wurde ein Fall ausgeschlossen, der offensichtlich von den anderen Fällen massiv abwich. Es handelte sich hierbei um den ersten in die Untersuchung eingeschlossenen Probanden. Dieser Proband wurde noch nicht mit der endgültigen Version des Studienprotokolls untersucht, so dass die Unterschiede möglicherweise durch die leicht abweichende Methodik erklärbar sind.

Die ausgewertete Population dezimierte sich somit auf 25 Probanden. Diese teilten sich in 13 Kontrollprobanden und 12 Therapieprobanden auf. Im Durchschnitt waren diese 64,8 (SD: 11,5) Jahre alt, wobei der jüngste Proband 46 Jahre und der älteste Proband 82 Jahre alt war. Sieben Probanden waren weiblich, 18 waren männlich. Es wurde bei 12 Probanden ein aortocoronarer Bypass (ACB), bei 7 Probanden ein ACB in Kombination mit einem weiteren Eingriff und bei 6 Probanden ein anderer herzchirurgischer Eingriff durchgeführt. Die präoperativ erhobene Ejektionsfraktion, als Maß der Herzleistung, lag im Durchschnitt bei 58 % (SD: 8,9).

3.2.1 Vitale PBMC

Die präoperativ erhobenen Messwerte für die Konzentration vitaler mononuklearer Zellen aus peripherem Blut (PBMC) zeigten im t-Test keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p=0,657$) zwischen den Vergleichsgruppen. Im Levene-Test zeigte sich keine Varianzhomogenität ($p=0,270$). Im Test nach Shapiro-Wilk zeigten die präoperativ erhobenen Messwerte keine Signifikanz ($p=0,194$), so dass eine Normalverteilung der Werte angenommen werden kann. Der Mauchly-Test auf Sphärizität lieferte ein höchst signifikantes Ergebnis ($p=0,001$). Es wurde daher die Korrektur nach Huynh-Feldt zur weiteren Beurteilung der Ergebnisse verwendet. Der zeitliche Verlauf der Messwerte (Innersubjekteffekte, Univariate), unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit, zeigte über den Beobachtungszeitraum einen signifikanten Unterschied ($p=0,022$), unter Berücksichtigung der Gruppenzugehörigkeit zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied ($p=0,671$) zwischen den Gruppen. Der Vergleich, ohne Beachtung des zeitlichen Verlaufes der Messwerte (Zwischensubjekteffekt), zeigte keinen signifikanten Unterschied ($p=0,609$).

	präOP	6h postOP	48h postOP	6d postOP
Kontrollgruppe	1431,76 ± 90,94	2328,47 ± 251,03	1803,65 ± 195,67	1882,18 ± 172,36
Therapiegruppe	1359,81 ± 130,96	2392,19 ± 713,42	1883,33 ± 190,95	2374,31 ± 334,87

Tabelle 3.2.1 Ermittelte Konzentration vitaler mononuklearer Zellen pro ml Blut [$\times 10^3/\text{ml}$]. Aufgeführt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes.

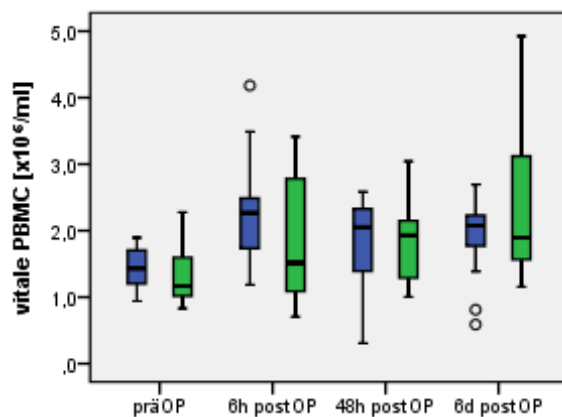


Abbildung 3.1 Boxplot-Darstellung vitale PBMC (blau = Kontrollgruppe, grün = Therapiegruppe, Kreis = Ausreißer, Raute = Extremwert)

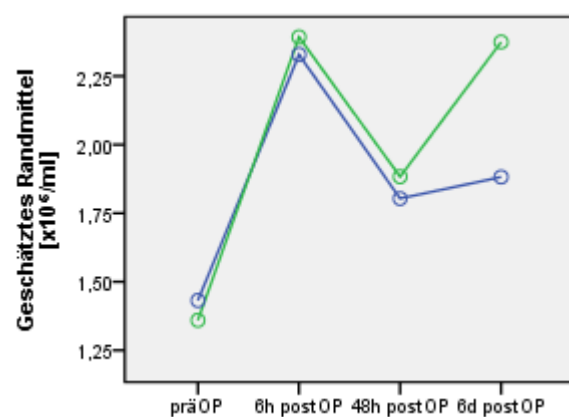


Abbildung 3.2 ANOVA-Auswertung vitale PBMC Die Linien stellen den Verlauf des geschätzten Randmittels laut ANOVA-Auswertung dar. (blau = Kontrollgruppe, grün = Therapiegruppe)

3.2.2 CD184+ Zellen

Die präoperativ erhobenen Messwerte für die Konzentration CD184+ Zellen zeigten im t-Test signifikante Unterschiede ($p=0,026$) zwischen den Vergleichsgruppen. Es zeigte sich keine Varianzhomogenität im Levene-Test ($p=0,301$). Eine Normalverteilung der Werte wurde angenommen, da sich präoperativ im Test nach Shapiro-Wilk keine Signifikanz zeigte ($p=0,179$). Der Mauchly-Test auf Sphärizität lieferte ein höchst signifikantes Ergebnis ($p=0,001$). Im Weiteren wurde die Korrektur nach Huynh-Feldt zur Beurteilung der Ergebnisse verwendet. Der zeitliche Verlauf der Messwerte (Innersubjekteffekte), unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit, zeigte einen grenzwertig nicht signifikanten Unterschied ($p=0,053$) über den Beobachtungszeitraum, unter Berücksichtigung der Gruppenzugehörigkeit zeigte sich weiterhin ein signifikanter Unterschied ($p=0,028$) zwischen den Gruppen. Der Vergleich, ohne Beachtung des zeitlichen Verlaufes der Messwerte (Zwischensubjekteffekt), zeigte ebenfalls einen signifikanten Unterschied ($p=0,023$).

	präOP	6h postOP	48h postOP	6d postOP
Kontrollgruppe	260,27 ± 34,56	529,92 ± 76,29	391,76 ± 59,03	297,52 ± 53,14
Therapiegruppe	412,49 ± 52,88	509,42 ± 76,83	521,37 ± 54,38	727,73 ± 158,69

Tabelle 3.2.2 Ermittelte Konzentration CD184+ Zellen pro ml Blut [$\times 10^3/\text{ml}$]. Aufgeführt sind die Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes.

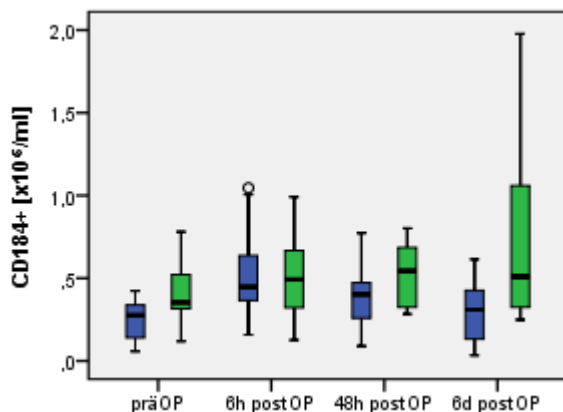


Abbildung 3.3 Boxplot-Darstellung CD184+ (blau = Kontrollgruppe, grün = Therapiegruppe, Kreis = Ausreißer, Raute = Extremwert)

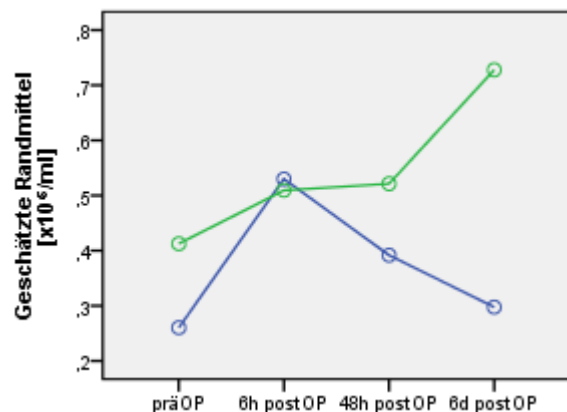


Abbildung 3.4 ANOVA-Auswertung CD184+ Die Linien stellen den Verlauf des geschätzten Randmittels laut ANOVA-Auswertung dar. (blau = Kontrollgruppe, grün = Therapiegruppe)

3.2.3 CD14+ Monozyten

Der Test nach Shapiro-Wilk zeigte für die präoperativ erhobenen Messwerte, für die Konzentration CD14+ Monozyten, höchste Signifikanz ($p=0,001$), so dass keine Normalverteilung der Werte angenommen werden kann. Diese Messwerte zeigten im U-Test nach Mann-Whitney keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p=0,320$) zwischen den Vergleichsgruppen. Der Mauchly-Test auf Sphärizität lieferte kein signifikantes Ergebnis ($p=0,158$). Die Sphärizität wurde somit als gegeben angenommen. Der zeitliche Verlauf der Messwerte (Innersubjekteffekte), unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit, zeigte einen höchst signifikanten Unterschied ($p=0,001$) über den Beobachtungszeitraum, unter Berücksichtigung der Gruppenzugehörigkeit zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied ($p=0,250$) zwischen den Gruppen. Der Vergleich, ohne Beachtung des zeitlichen Verlaufes der Messwerte (Zwischensubjekteffekt), zeigte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied ($p=0,308$).

	präOP	6h postOP	48h postOP	6d postOP
Kontrollgruppe	84,30 ± 21,89	347,80 ± 58,41	418,83 ± 105,89	203,24 ± 51,09
Therapiegruppe	155,83 ± 47,11	354,89 ± 86,78	432,54 ± 76,93	404,73 ± 62,78

Tabelle 3.2.3 Ermittelte Konzentration CD14+ Monozyten pro ml Blut [$\times 10^3/\text{ml}$]. Aufgeführt sind die Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes.

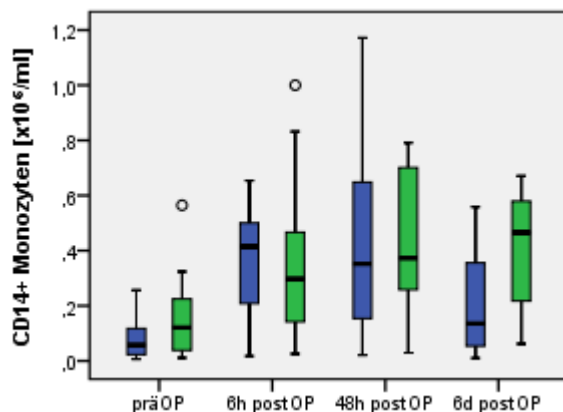


Abbildung 3.5 Boxplot-Darstellung Monozyten (blau = Kontrollgruppe, grün = Therapiegruppe, Kreis = Ausreißer, Raute = Extremwert)

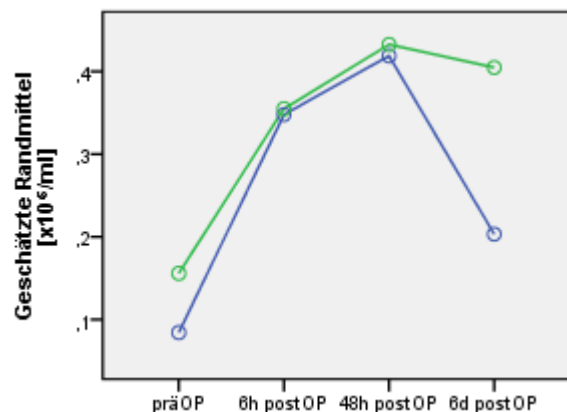


Abbildung 3.6 ANOVA-Auswertung Monozyten. Die Linien stellen den Verlauf des geschätzten Randmittels laut ANOVA-Auswertung dar. (blau = Kontrollgruppe, grün = Therapiegruppe)

3.2.4 ISHAGE CD34+

Die präoperativ erhobenen Messwerte für die Konzentration CD34+ Stammzellen nach ISHAGE-Protokoll zeigten im U-Test nach Mann-Whitney keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p=0,728$) zwischen den Vergleichsgruppen. Im Test nach Shapiro-Wilk zeigten die präoperativ erhobenen Messwerte höchste Signifikanz ($p=0,001$), so dass keine Normalverteilung der Werte angenommen werden kann. Der Mauchly-Test auf Sphärizität lieferte ein höchst signifikantes Ergebnis ($p=0,001$). Es wurde die Korrektur nach Huynh-Feldt zur weiteren Beurteilung der Ergebnisse verwendet. Der zeitliche Verlauf der Messwerte (Innersubjekteffekte), unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit, zeigte einen höchst signifikanten Unterschied ($p=0,001$) über den Beobachtungszeitraum, unter Berücksichtigung der Gruppenzugehörigkeit zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied ($p=0,563$) zwischen den Gruppen. Der Vergleich, ohne Beachtung des zeitlichen Verlaufes der Messwerte (Zwischensubjekteffekt), zeigte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied ($p=0,795$).

	präOP	6h postOP	48h postOP	6d postOP
Kontrollgruppe	678,75 ± 194,94	1160,40 ± 247,30	708,26 ± 150,22	1671,43 ± 435,77
Therapiegruppe	609,21 ± 112,20	1398,26 ± 323,63	508,89 ± 113,44	1428,49 ± 231,57

Tabelle 3.2.4 Ermittelte Konzentration CD34+ Stammzellen pro ml Blut [ml^{-1}]. Aufgeführt sind die Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes.

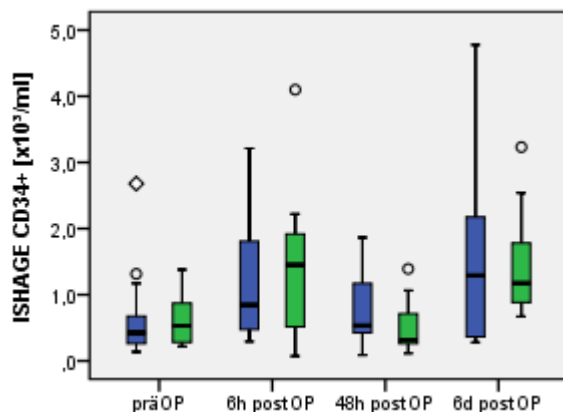


Abbildung 3.7 Boxplot-Darstellung CD34+ (blau = Kontrollgruppe, grün = Therapiegruppe, Kreis = Ausreißer, Raute = Extremwert)

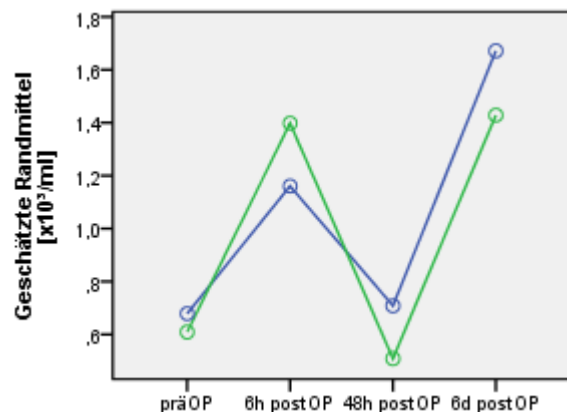


Abbildung 3.8 ANOVA-Auswertung CD34+ Die Linien stellen den Verlauf des geschätzten Randmittels laut ANOVA-Auswertung dar. (blau = Kontrollgruppe, grün = Therapiegruppe)

3.2.5 ISHAGE CD34+ CD133+

Die präoperativen Messwerte für die Konzentration CD34+ CD133+ Stammzellen nach ISHAGE-Protokoll zeigten im U-Test nach Mann-Whitney keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p=0,689$) zwischen den Vergleichsgruppen. Im Test nach Shapiro-Wilk zeigten die präoperativ erhobenen Messwerte höchste Signifikanz ($p=0,001$), so dass keine Normalverteilung der Werte angenommen werden kann. Der Mauchly-Test auf Sphärizität lieferte ein höchst signifikantes Ergebnis ($p=0,001$). Es wurde die Korrektur nach Huynh-Feldt zur weiteren Beurteilung der Ergebnisse verwendet. Der zeitliche Verlauf der Messwerte (Innersubjekteffekte), unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit, zeigte einen höchst signifikanten Unterschied ($p=0,001$) über den Beobachtungszeitraum, unter Berücksichtigung der Gruppenzugehörigkeit zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied ($p=0,720$) zwischen den Gruppen. Der Vergleich, ohne Beachtung des zeitlichen Verlaufes der Messwerte (Zwischensubjekteffekt), zeigte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied ($p=0,928$).

	präOP	6h postOP	48h postOP	6d postOP
Kontrollgruppe	364,28 ± 103,09	651,86 ± 170,40	360,07 ± 76,46	1089,60 ± 307,55
Therapiegruppe	343,35 ± 73,03	882,87 ± 196,38	297,32 ± 65,43	1061,97 ± 162,58

Tabelle 3.2.5 Ermittelte Konzentration CD34+ CD133+ Stammzellen pro ml Blut [ml^{-1}]. Aufgeführt sind die Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes.

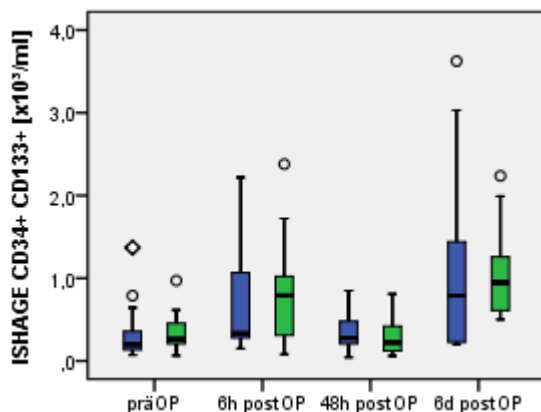


Abbildung 3.9 Boxplot-Darstellung CD34/133+ (blau = Kontrollgruppe, grün = Therapiegruppe, Kreis = Ausreißer, Raute = Extremwert)

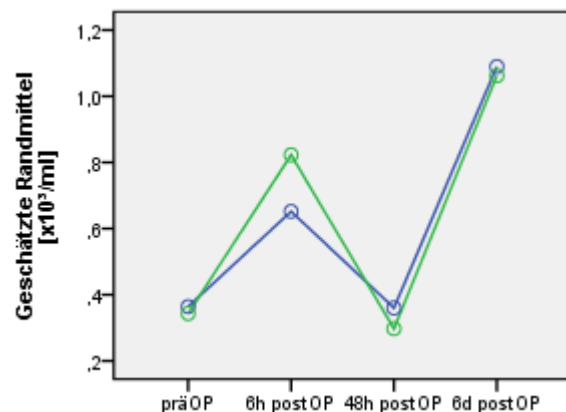


Abbildung 3.10 ANOVA-Auswertung CD34/133+ Die Linien stellen den Verlauf des geschätzten Randmittels laut ANOVA-Auswertung dar. (blau = Kontrollgruppe, grün = Therapiegruppe)

3.2.6 ISHAGE CD34+ CD117+

Der Test nach Shapiro-Wilk zeigten die präoperativ erhobenen Messwerte für die Konzentration CD34+ CD117+ Stammzellen nach ISHAGE-Protokoll höchste Signifikanz ($p=0,001$), so dass keine Normalverteilung der Werte angenommen werden kann. Diese Messwerte zeigten darüberhinaus im U-Test nach Mann-Whitney keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p=0,650$) zwischen den Vergleichsgruppen. Der Mauchly-Test auf Sphärizität lieferte ein höchst signifikantes Ergebnis ($p=0,001$). Entsprechend wurde die Korrektur nach Huynh-Feldt zur weiteren Beurteilung der Ergebnisse verwendet. Der zeitliche Verlauf der Messwerte (Innersubjekteffekte), unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit, zeigte einen höchst signifikanten Unterschied ($p=0,001$) über den Beobachtungszeitraum, unter Berücksichtigung der Gruppenzugehörigkeit zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied ($p=0,669$) zwischen den Gruppen. Der Vergleich, ohne Beachtung des zeitlichen Verlaufes der Messwerte (Zwischensubjekteffekt), zeigte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied ($p=0,518$).

	präOP	6h postOP	48h postOP	6d postOP
Kontrollgruppe	297,43 ± 86,26	564,03 ± 114,93	336,50 ± 80,95	1055,67 ± 295,55
Therapiegruppe	219,30 ± 51,14	598,95 ± 128,10	207,39 ± 45,27	860,50 ± 174,18

Tabelle 3.2.6 Ermittelte Konzentration CD34+ CD117+ Stammzellen pro ml Blut [ml^{-1}]. Aufgeführt sind die Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes.

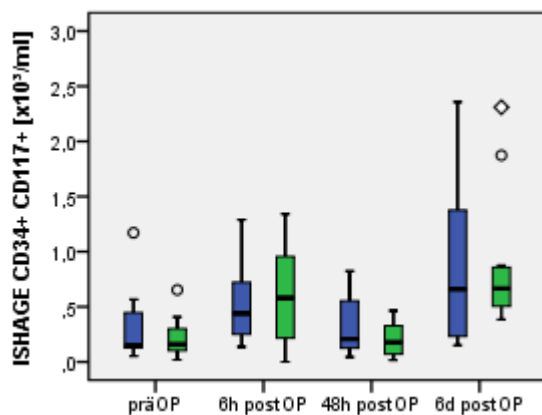


Abbildung 3.11 Boxplot-Darstellung CD34/117+ (blau = Kontrollgruppe, grün = Therapiegruppe, Kreis = Ausreißer, Raute = Extremwert)

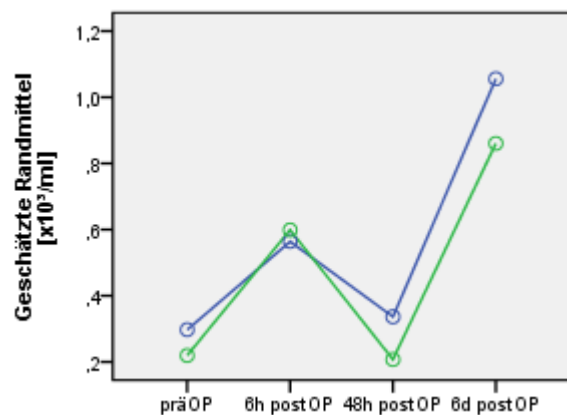


Abbildung 3.12 ANOVA-Auswertung CD34/117+ Die Linien stellen den Verlauf des geschätzten Randmittels laut ANOVA-Auswertung dar. (blau = Kontrollgruppe, grün = Therapiegruppe)

3.2.7 ISHAGE CD34+ CD184+

Die präoperativ erhobenen Messwerte für die Konzentration CD34+ CD184+ Stammzellen nach ISHAGE-Protokoll zeigten im U-Test nach Mann-Whitney statistisch signifikante Unterschiede ($p=0,040$) zwischen den Vergleichsgruppen. Im Test nach Shapiro-Wilk zeigten die präoperativ erhobenen Messwerte hohe Signifikanz ($p=0,004$), so dass keine Normalverteilung der Werte angenommen werden kann. Der Mauchly-Test auf Sphärizität lieferte ein höchst signifikantes Ergebnis ($p=0,001$). Es wurde die Korrektur nach Huynh-Feldt zur weiteren Beurteilung der Ergebnisse verwendet. Der zeitliche Verlauf der Messwerte (Innersubjekteffekte), unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit, zeigte einen hoch signifikanten Unterschied ($p=0,003$) über den Beobachtungszeitraum, unter Berücksichtigung der Gruppenzugehörigkeit zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied ($p=0,807$) zwischen den Gruppen. Der Vergleich, ohne Beachtung des zeitlichen Verlaufes der Messwerte (Zwischensubjekteffekt), zeigte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied ($p=0,171$).

	präOP	6h postOP	48h postOP	6d postOP
Kontrollgruppe	26,35 ± 4,84	120,80 ± 35,69	46,70 ± 9,44	92,05 ± 29,87
Therapiegruppe	48,89 ± 8,65	143,39 ± 43,85	53,33 ± 16,63	139,78 ± 26,88

Tabelle 3.2.7 Ermittelte Konzentration CD34+ CD184+ Stammzellen pro ml Blut [ml^{-1}]. Aufgeführt sind die Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes.

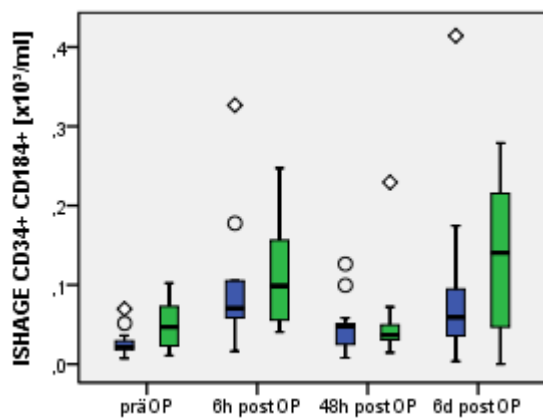


Abbildung 3.13 Boxplot-Darstellung CD34/184+ (blau = Kontrollgruppe, grün = Therapiegruppe, Kreis = Ausreißer, Raute = Extremwert)

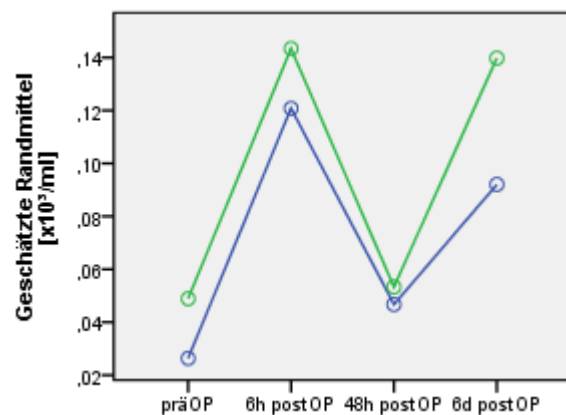


Abbildung 3.14 ANOVA-Auswertung CD34/184+ Die Linien stellen den Verlauf des geschätzten Randmittels laut ANOVA-Auswertung dar. (blau = Kontrollgruppe, grün = Therapiegruppe)

3.2.8 ISHAGE CD34+ CD133+ CD117+

Die präoperativ erhobenen Messwerte für die Konzentration CD34+ CD133+ CD117+ Stammzellen nach ISHAGE-Protokoll zeigten im U-Test nach Mann-Whitney keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p=0,728$) zwischen den Vergleichsgruppen. Im Test nach Shapiro-Wilk zeigten die präoperativ erhobenen Messwerte höchste Signifikanz ($p=0,001$), so dass keine Normalverteilung der Werte angenommen werden kann. Der Mauchly-Test auf Sphärizität lieferte ein höchst signifikantes Ergebnis ($p=0,001$). Die Korrektur nach Huynh-Feldt wurde zur weiteren Beurteilung der Ergebnisse verwendet. Der zeitliche Verlauf der Messwerte (Innersubjekteffekte), unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit, zeigte einen höchst signifikanten Unterschied ($p=0,001$) über den Beobachtungszeitraum, unter Berücksichtigung der Gruppenzugehörigkeit zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied ($p=0,777$) zwischen den Gruppen. Der Vergleich, ohne Beachtung des zeitlichen Verlaufes der Messwerte (Zwischensubjekteffekt), zeigte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied ($p=0,832$).

	präOP	6h postOP	48h postOP	6d postOP
Kontrollgruppe	152,80 ± 46,98	358,75 ± 85,95	172,39 ± 49,58	703,58 ± 226,23
Therapiegruppe	111,22 ± 33,12	419,13 ± 92,78	114,46 ± 29,11	658,59 ± 131,23

Tabelle 3.2.8 Ermittelte Konzentration CD34+ CD133+ CD117+ Stammzellen pro ml Blut [ml^{-1}]. Aufgeführt sind die Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes.

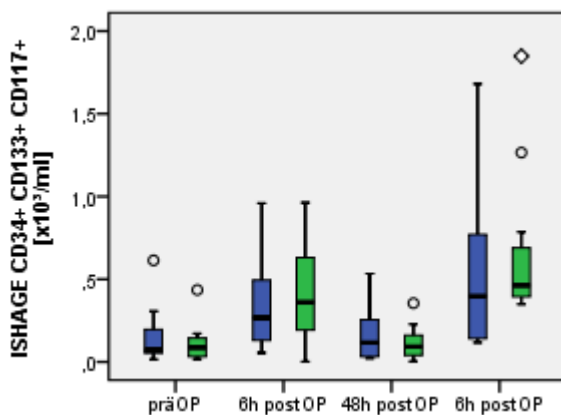


Abbildung 3.15 Boxplot-Darstellung CD34/133/117+ (blau = Kontrollgruppe, grün = Therapiegruppe, Kreis = Ausreißer, Raute = Extremwert)

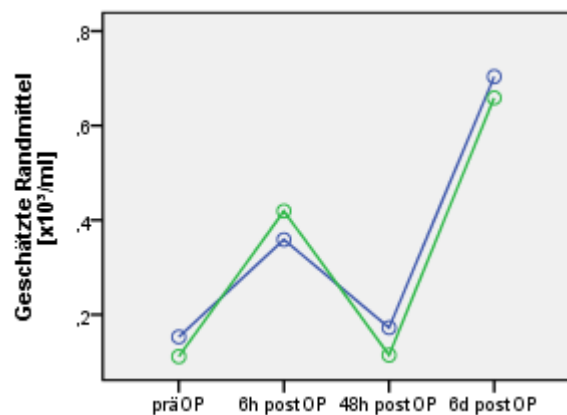


Abbildung 3.16 ANOVA-Auswert. CD34/133/117+ Die Linien stellen den Verlauf des geschätzten Randmittels laut ANOVA-Auswertung dar. (blau = Kontrollgruppe, grün = Therapiegruppe)

3.2.9 ISHAGE CD34+ CD133+ CD184+

Die präoperativ erhobenen Messwerte für die Konzentration CD34+ CD133+ CD184+ Stammzellen nach ISHAGE-Protokoll zeigten im U-Test nach Mann-Whitney keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p=0,152$) zwischen den Vergleichsgruppen. Im Test nach Shapiro-Wilk zeigten die präoperativ erhobenen Messwerte höchste Signifikanz ($p=0,001$), so dass keine Normalverteilung der Werte angenommen werden kann. Der Mauchly-Test auf Sphärizität lieferte ein hoch signifikantes Ergebnis ($p=0,002$). Entsprechend wurde die Korrektur nach Huynh-Feldt zur weiteren Beurteilung der Ergebnisse verwendet. Der zeitliche Verlauf der Messwerte (Innersubjekteffekte), unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit, zeigte einen höchst signifikanten Unterschied ($p=0,001$) über den Beobachtungszeitraum, unter Berücksichtigung der Gruppenzugehörigkeit zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied ($p=0,333$) zwischen den Gruppen. Der Vergleich, ohne Beachtung des zeitlichen Verlaufes der Messwerte (Zwischensubjekteffekt), zeigte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied ($p=0,171$).

	präOP	6h postOP	48h postOP	6d postOP
Kontrollgruppe	14,37 ± 3,88	63,03 ± 19,96	21,74 ± 6,49	67,14 ± 20,75
Therapiegruppe	30,77 ± 7,66	52,83 ± 9,75	38,10 ± 16,69	110,92 ± 23,89

Tabelle 3.2.9 Ermittelte Konzentration CD34+ CD133+ CD184+ Stammzellen pro ml Blut [ml^{-1}]. Aufgeführt sind die Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes.

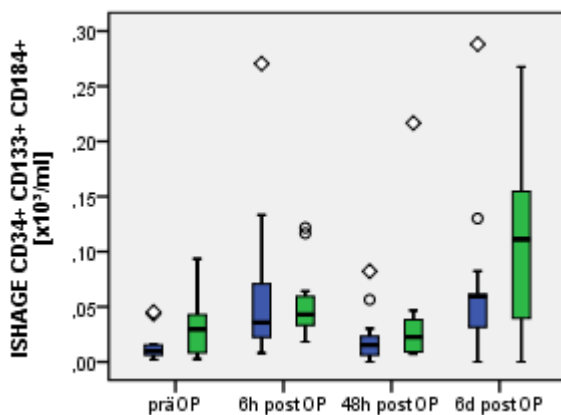


Abbildung 3.17 Boxplot-Darstellung CD34/133/184+ (blau = Kontrollgruppe, grün = Therapiegruppe, Kreis = Ausreißer, Raute = Extremwert)

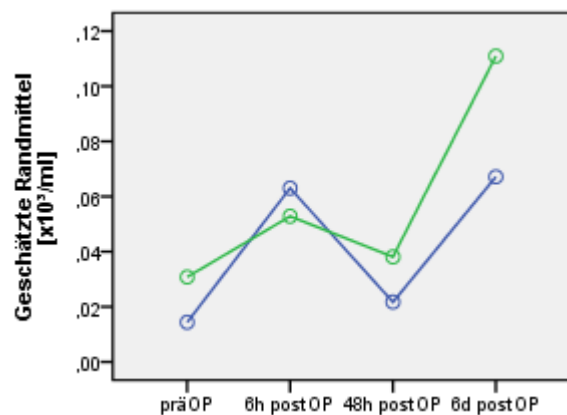


Abbildung 3.18 ANOVA-Auswert. CD34/133/184+ Die Linien stellen den Verlauf des geschätzten Randmittels laut ANOVA-Auswertung dar. (blau = Kontrollgruppe, grün = Therapiegruppe)

3.2.10 ISHAGE CD133+

Eine Normalverteilung der präoperativ erhobenen Messwerte für die Konzentration CD133+ Stammzellen nach ISHAGE-Protokoll konnte nicht angenommen werden, da sich im Test nach Shapiro-Wilk höchste Signifikanz ($p=0,001$) zeigte. Weiter zeigten im U-Test nach Mann-Whitney keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p=0,999$) für die präoperativ erhobenen Messwerte zwischen den Vergleichsgruppen. Der Mauchly-Test auf Sphärizität lieferte ein höchst signifikantes Ergebnis ($p=0,001$). Es wurde die Korrektur nach Huynh-Feldt zur weiteren Beurteilung der Ergebnisse verwendet. Der zeitliche Verlauf der Messwerte (Innersubjekteffekte), unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit, zeigte einen höchst signifikanten Unterschied ($p=0,001$) über den Beobachtungszeitraum, unter Berücksichtigung der Gruppenzugehörigkeit zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied ($p=0,626$) zwischen den Gruppen. Der Vergleich, ohne Beachtung des zeitlichen Verlaufes der Messwerte (Zwischensubjekteffekt), zeigte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied ($p=0,896$).

	präOP	6h postOP	48h postOP	6d postOP
Kontrollgruppe	449,63 ± 107,69	707,73 ± 137,22	438,57 ± 97,45	1252,01 ± 359,42
Therapiegruppe	382,65 ± 61,87	890,42 ± 201,46	314,26 ± 67,35	1169,94 ± 173,83

Tabelle 3.2.10 Ermittelte Konzentration CD133+ Stammzellen pro ml Blut [ml^{-1}]. Aufgeführt sind die Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes.

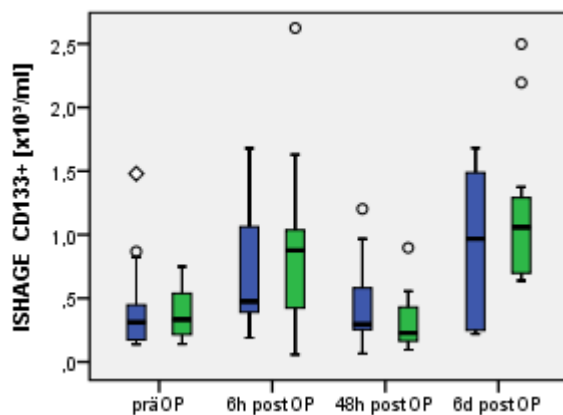


Abbildung 3.19 Boxplot-Darstellung CD133+ (blau = Kontrollgruppe, grün = Therapiegruppe, Kreis = Ausreißer, Raute = Extremwert)

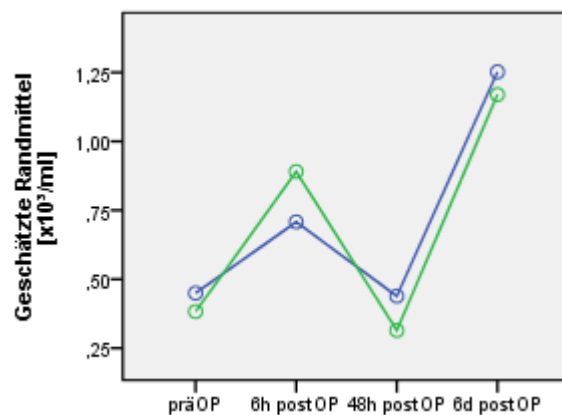


Abbildung 3.20 ANOVA-Auswertung CD133+ Die Linien stellen den Verlauf des geschätzten Randmittels laut ANOVA-Auswertung dar. (blau = Kontrollgruppe, grün = Therapiegruppe)

3.2.11 ISHAGE CD133+ CD117+

Die präoperativ erhobenen Messwerte für die Konzentration CD133+ CD117+ Stammzellen nach ISHAGE-Protokoll zeigten im U-Test nach Mann-Whitney keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p=0,574$) zwischen den Vergleichsgruppen. Im Test nach Shapiro-Wilk zeigten die präoperativ erhobenen Messwerte höchste Signifikanz ($p=0,001$), so dass keine Normalverteilung der Werte angenommen werden kann. Der Mauchly-Test auf Sphärizität lieferte ein höchst signifikantes Ergebnis ($p=0,001$). Es wurde die Korrektur nach Huynh-Feldt zur weiteren Beurteilung der Ergebnisse verwendet. Der zeitliche Verlauf der Messwerte (Innersubjekteffekte), unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit, zeigte einen höchst signifikanten Unterschied ($p=0,001$) über den Beobachtungszeitraum, unter Berücksichtigung der Gruppenzugehörigkeit zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied ($p=0,761$) zwischen den Gruppen. Der Vergleich, ohne Beachtung des zeitlichen Verlaufes der Messwerte (Zwischensubjekteffekt), zeigte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied ($p=0,687$).

	präOP	6h postOP	48h postOP	6d postOP
Kontrollgruppe	171,87 ± 46,42	373,81 ± 73,41	202,45 ± 57,16	788,38 ± 248,64
Therapiegruppe	124,97 ± 35,99	416,93 ± 85,23	125,03 ± 29,06	702,95 ± 143,84

Tabelle 3.2.11 Ermittelte Konzentration CD133+ CD117+ Stammzellen pro ml Blut [ml^{-1}]. Aufgeführt sind die Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes.

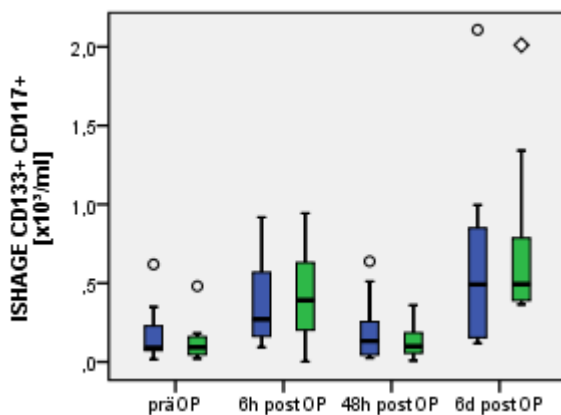


Abbildung 3.21 Boxplot-Darstellung CD133/117+ (blau = Kontrollgruppe, grün = Therapiegruppe, Kreis = Ausreißer, Raute = Extremwert)

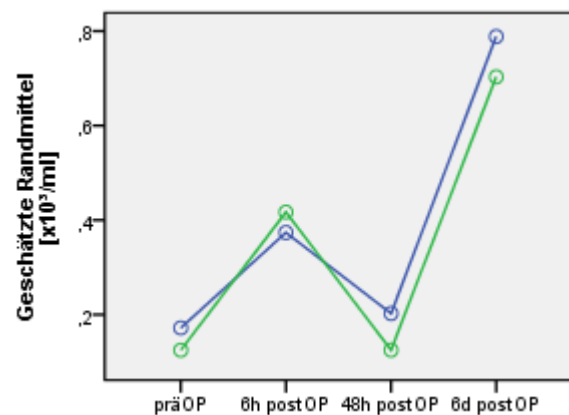


Abbildung 3.22 ANOVA-Auswertung CD133/117+ Die Linien stellen den Verlauf des geschätzten Randmittels laut ANOVA-Auswertung dar. (blau = Kontrollgruppe, grün = Therapiegruppe)

3.2.12 ISHAGE CD117+

Die präoperativ erhobenen Messwerte für die Konzentration CD117+ Stammzellen nach ISHAGE-Protokoll zeigten im U-Test nach Mann-Whitney keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p=0,406$) zwischen den Vergleichsgruppen. Im Test nach Shapiro-Wilk zeigten die präoperativ erhobenen Messwerte eine Signifikanz ($p=0,022$), so dass keine Normalverteilung der Werte angenommen werden kann. Der Mauchly-Test auf Sphärizität lieferte ein höchst signifikantes Ergebnis ($p=0,001$). Zur weiteren Beurteilung der Ergebnisse wurde die Korrektur nach Huynh-Feldt verwendet. Der zeitliche Verlauf der Messwerte (Innersubjekteffekte), unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit, zeigte einen höchst signifikanten Unterschied ($p=0,001$) über den Beobachtungszeitraum, unter Berücksichtigung der Gruppenzugehörigkeit zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied ($p=0,772$) zwischen den Gruppen. Der Vergleich, ohne Beachtung des zeitlichen Verlaufes der Messwerte (Zwischensubjekteffekt), zeigte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied ($p=0,825$).

	präOP	6h postOP	48h postOP	6d postOP
Kontrollgruppe	641,00 ± 107,75	780,04 ± 133,06	448,45 ± 76,47	1384,32 ± 281,55
Therapiegruppe	532,71 ± 130,62	891,05 ± 198,65	355,85 ± 66,02	1317,57 ± 295,44

Tabelle 3.2.12 Ermittelte Konzentration CD117+ Stammzellen pro ml Blut [ml^{-1}]. Aufgeführt sind die Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes.

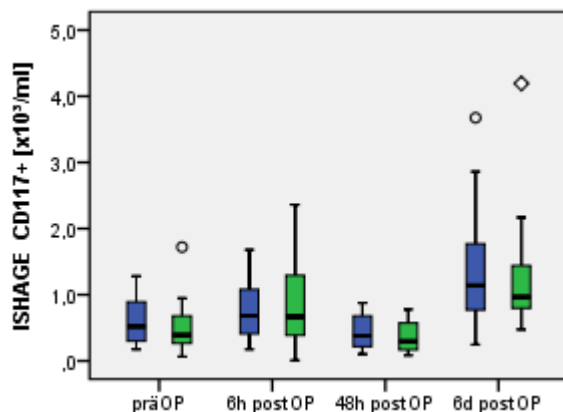


Abbildung 3.23 Boxplot-Darstellung CD117+ (blau = Kontrollgruppe, grün = Therapiegruppe, Kreis = Ausreißer, Raute = Extremwert)

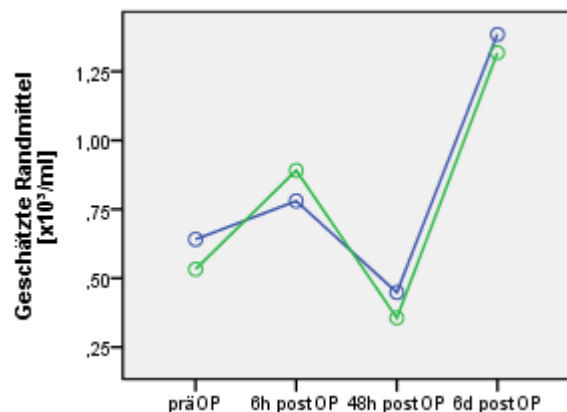


Abbildung 3.24 ANOVA-Auswertung CD117+ Die Linien stellen den Verlauf des geschätzten Randmittels laut ANOVA-Auswertung dar. (blau = Kontrollgruppe, grün = Therapiegruppe)

3.3 Koloniebildung (CFU-Hill)

Die Population, die für die CFU-Hill-Analyse zur Verfügung stand, war von Beginn an kleiner als die Gesamtstudienpopulation. Zum einen wurden aus ökonomischen Gründen nicht bei allen Probanden eine CFU-Hill Zellkultur angelegt, zum anderen zeigten sich im Verlauf der Untersuchung und vor allem am Anfang gelegentlich Kontaminationen der Kulturen, so dass diese nicht auswertbar waren. Durch eine methodische Besonderheit der ANOVA wurde die Anzahl der auswertbaren Fälle weiter limitiert. Diese kann nur Fälle auswerten, welche über alle Zeitpunkte Werte liefern, so dass Fälle, bei denen einzelne Zeitpunkte ausgefallen sind, nicht in die Analyse miteinbezogen werden konnten.

3.3.1 Analyse über alle Zeitpunkte

Die ausgewertete Population dezimierte sich somit auf 11 Probanden. Diese teilten sich in 5 Kontrollprobanden und 6 Therapieprobanden auf. Im Durchschnitt waren diese 66,9 (SD: 11,8) Jahre alt, wobei der jüngste Proband 42 Jahre und der älteste Proband 78 Jahre alt war. Es wurde bei 6 Probanden ein aortocoronarer Bypass (ACB), bei 3 Probanden ein ACB in Kombination mit einem weiteren Eingriff und bei 2 Probanden ein anderer herzchirurgischer Eingriff durchgeführt. Die präoperativ erhobene Ejektionsfraktion, als Maß der Herzleistung, lag in Durchschnitt bei 61,3 % (SD: 5,9).

Die präoperativ erhobenen Messwerte für die Anzahl von CFU-Hill Kolonien pro ml Blut zeigten im U-Test nach Mann-Whitney keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p=0,999$) zwischen den Vergleichsgruppen. Im Test nach Shapiro-Wilk zeigten die präoperativ erhobenen Messwerte keine Signifikanz ($p=0,060$), so dass eine Normalverteilung der Werte angenommen werden kann. Der Mauchly-Test auf Sphärizität lieferte kein signifikantes Ergebnis ($p=0,069$). Es wurde daher die Sphärizität als gegeben angenommen. Der zeitliche Verlauf der Messwerte (Innersubjekteffekte), unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit, zeigte grenzwertig keinen signifikanten Unterschied ($p=0,054$) über den Beobachtungszeitraum, auch unter Berücksichtigung der Gruppenzugehörigkeit zeigte sich kein signifikanter Unterschied ($p=0,824$) zwischen den Gruppen. Der Vergleich, ohne Beachtung des zeitlichen Verlaufes der Messwerte (Zwischensubjekteffekt), zeigte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied ($p=0,933$).

	präOP	6h postOP	48h postOP	6d postOP
Kontrollgruppe	135,54 ± 61,38	20,34 ± 8,75	38,71 ± 14,66	141,00 ± 93,63
Therapiegruppe	121,09 ± 34,47	28,93 ± 19,56	75,27 ± 33,17	101,52 ± 37,57

Tabelle 3.3.1 Ermittelte CFU-Hill Kolonien pro ml Blut [ml^{-1}].
Aufgeführt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes.

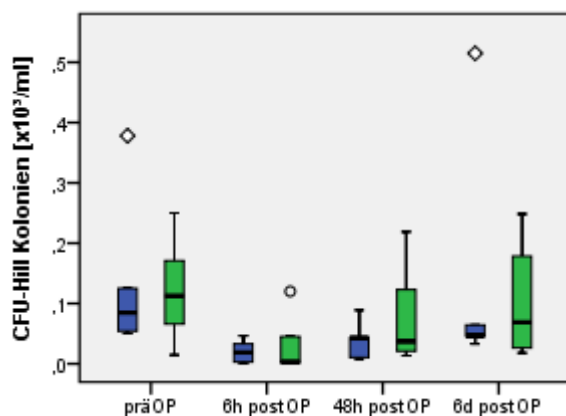


Abbildung 3.25 Boxplot-Darstellung CFU (alle)
(blau = Kontrollgruppe, grün = Therapiegruppe,
Kreis = Ausreißer, Raute = Extremwert)

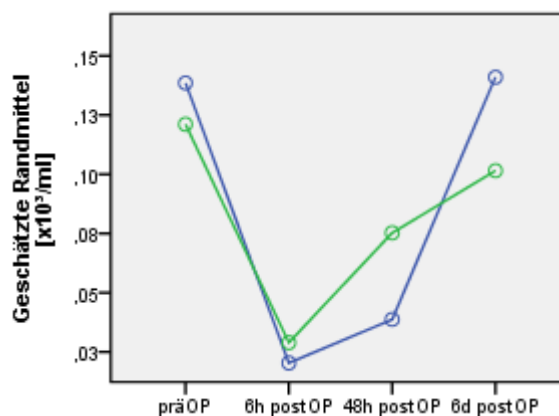


Abbildung 3.26 ANOVA-Auswertung CFU (alle)
Die Linien stellen den Verlauf des geschätzten
Randmittels laut ANOVA-Auswertung dar.
(blau = Kontrollgruppe, grün = Therapiegruppe)

3.3.2 Analyse über drei Zeitpunkte

Um die Anzahl der analysierbaren Probanden zu erhöhen, wurde in einer zweiten Analyse auf die Einbeziehung der Daten von der 48h postOP Probe verzichtet, da dieses die maximale Anzahl an Probanden hervorbrachte, ohne auf die Analyse der Daten der 6d postOP Probe verzichten zu müssen.

Somit konnten in der zweiten Analyse 15 Probanden eingeschlossen werden. Diese teilten sich in 8 Kontrollprobanden und 7 Therapieprobanden auf. Im Durchschnitt waren diese 65,0 (SD: 11,6) Jahre alt, wobei der jüngste Proband 42 Jahre und der älteste Proband 78 Jahre alt war. Es wurde bei 7 Probanden ein aortocoronarer Bypass (ACB), bei 4 Probanden ein ACB in Kombination mit einem weiteren Eingriff und bei 4 Probanden ein anderer herzchirurgischer Eingriff durchgeführt. Die präoperativ erhobene Ejektionsfraktion, als Maß der Herzleistung, lag im Durchschnitt bei 58,9 % (SD: 8,9).

Die präoperativ erhobenen Messwerte für die Anzahl von CFU-Hill Kolonien pro ml Blut zeigten im U-Test nach Mann-Whitney keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p=0,999$) zwischen den Vergleichsgruppen. Im Test nach Shapiro-Wilk zeigten die präoperativ erhobenen Messwerte eine hohe Signifikanz ($p=0,005$), so dass keine Normalverteilung der Werte angenommen werden kann. Der Mauchly-Test auf Sphärizität lieferte ein höchst signifikantes Ergebnis ($p=0,001$). Es wurde daher die Korrektur nach Huynh-Feldt zur weiteren Beurteilung der Ergebnisse verwendet. Der zeitliche Verlauf der Messwerte (Innersubjekteffekte), unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit, zeigte keinen signifikanten Unterschied ($p=0,081$) über den Beobachtungszeitraum, auch unter Berücksichtigung der Gruppenzugehörigkeit zeigte sich kein signifikanter Unterschied ($p=0,918$) zwischen den Gruppen. Der

Vergleich, ohne Beachtung des zeitlichen Verlaufes der Messwerte (Zwischensubjekteffekt), zeigte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied ($p=0,830$).

	präOP	6h postOP	6d postOP
Kontrollgruppe	122,90 ± 37,94	49,31 ± 23,73	267,11 ± 125,77
Therapiegruppe	112,45 ± 30,39	51,52 ± 28,00	232,80 ± 135,07

Tabelle 3.3.2 Ermittelte CFU-Hill Kolonien pro ml Blut [ml^{-1}].
Aufgeführt sind die Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes.

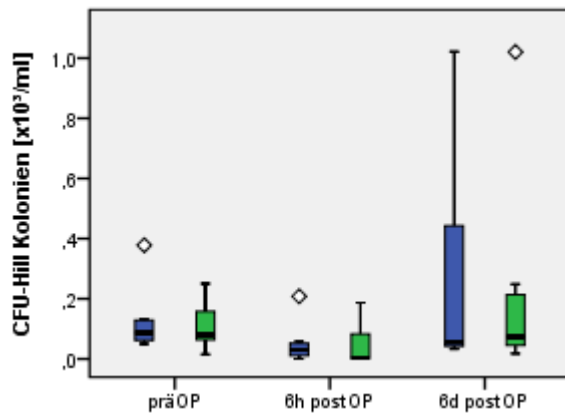


Abbildung 3.27 Boxplot-Darstellung CFU (drei)
(blau = Kontrollgruppe, grün = Therapiegruppe,
Kreis = Ausreißer, Raute = Extremwert)

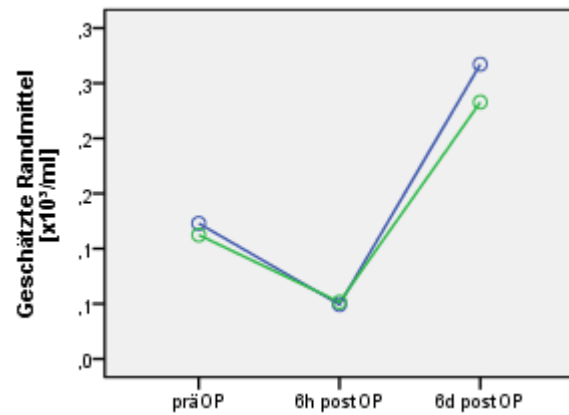


Abbildung 3.28 ANOVA-Auswertung CFU (drei)
Die Linien stellen den Verlauf des geschätzten
Randmittels laut ANOVA-Auswertung dar.
(blau = Kontrollgruppe, grün = Therapiegruppe)

4 Diskussion

Die vorliegende wissenschaftliche Arbeit beschäftigt sich mit dem Einfluss der ischämischen Remotepräkonditionierung (RIPC) auf die Mobilisierung endothelialer Progenitorzellen (EPC).

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung eines entsprechenden Zusammenhangs. Bekannt ist, dass sowohl die ischämische Präkonditionierung (RIPC) [42], als auch die Transplantation endothelialer Progenitorzellen (EPC) [5], positive Effekte auf die Regeneration ischämisch geschädigter Myokardareale aufweisen. Für die RIPC wurden jedoch zu Beginn dieser Arbeit lediglich nicht-zelluläre Mechanismen beschrieben.

Zum Zwecke dieser Untersuchung wurde freiwilligen Probanden, welche sich im Rahmen der RIPHeart-Studie [69] einer elektiven Herzoperation unterzogen, zu festgelegten Zeitpunkten Blut entnommen, welches quantitativ auf EPC untersucht wurde. Eine vorherige Randomisierung mit Zuordnung zu einer Therapie- oder Kontrollgruppe wurde durch das Studienzentrum der RIPHeart-Studie durchgeführt, so dass eine doppelte Verblindung möglich war.

Innerhalb der untersuchten EPC-Populationen zeigten sich weder in der Durchflusszytometrie (FACS) noch in der Zellkultur (CFU-Hill) im Verlauf signifikante Unterschiede zwischen der Therapie- und Kontrollgruppe. Es konnten jedoch signifikante Veränderungen der Zellkonzentration im zeitlichen Verlauf unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit gezeigt werden. So imponierte nach initialem postoperativem Anstieg der EPC-Zahl nach 48 Stunden ein Abfall, gefolgt von einem erneuten Anstieg der Zellkonzentration am sechsten postoperativen Tag. Darüber hinaus wurden Hinweise auf Effekte bei einer Zellpopulation, welche nicht zu den originär untersuchten EPC zählen, gefunden. So zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Therapie- und Kontrollgruppe bei CD184+ Zellen. Dieser Marker wird, wie bereits einleitend gezeigt, von verschiedenen Zellpopulationen exprimiert, so dass eine Zuordnung zu einer definieren Population durch alleinige Analyse von CD184 nicht möglich ist.

4.1 Zellpopulationen in der Durchflusszytometrie

4.1.1 Vitale PBMC

Die zur Analyse herangezogene Zellsuspension enthält entsprechend der Herstellerangaben [35] $95 \pm 5\%$ mononukleäre Zellen (PBMC), $5 \pm 5\%$ Granulozyten und weniger als 1% Erythrozyten. Die Vitalität der Zellen wird mit $95 \pm 5\%$ angegeben. Eine Untersuchung von Granulozyten war nicht Ziel dieser Arbeit, so dass auf einen spezifischen Granulozytenmarker verzichtet wurde. Für nachfolgende Untersuchungen wurden die Ergebnisse auf durchflusszytometrisch bestimmte vitale PBMC bezogen.

Die beiden größten Zellpopulationen der PBMC, die Monozyten und Lymphozyten, unterliegen Änderungen der Zellzahlen und -konzentrationen im Zeitverlauf von Herzoperationen. So zeigt sich ein postoperativer Anstieg bei den Monozyten, wohingegen die Lymphozyten abfallen. [86] Dies steht im Einklang mit den erhobenen Daten für CD14+ Monozyten. Wahrscheinlich sind diese Effekte auf das Auftretenden eines systemic inflammatory response syndrome (SIRS) zurückzuführen. [38] Mögliche

Auswirkungen dieser Vorgänge auf die Messung anderer Zellpopulationen wurden durch Normierung der Werte auf Anzahl der Zellen pro Volumen der Blutprobe minimiert.

Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Therapie- und Kontrollgruppe. Es konnte jedoch eine signifikante Änderung im Zeitverlauf, ohne Berücksichtigung der Gruppenzugehörigkeit, gezeigt werden. Dies deckt sich mit den Beobachtungen vorgenannter Autoren. [86, 38]

4.1.2 CD184+ PBMC

CD184 spielt als SDF-1-Rezeptor in der Migration von Stammzellen nach kardialer Schädigung eine wichtige Rolle. [1] Er wird sowohl von hämatopoetischen Stammzellen [15], als auch wie bereits gezeigt von ausdifferenzierten Zellen, beispielsweise Mono- [15] oder Granulozyten, [17] exprimiert.

In der Literatur finden sich heterogene Angaben zur physiologischen Konzentration von CD184+ Zellen. So fanden Egan *et al.* bei der Untersuchung von Kontrollkollektiven $24,8 \pm 3,3\%$ (2011) sowie $19,4 \pm 2,8\%$ (2009) CD184+ Zellen in ihrer Untersuchung. [28, 29] Bei Patienten mit einer KHK fanden sie dagegen mit $7,7 \pm 1,2\%$ signifikant ($p=0,0001$) niedrigere Konzentrationen. [29] Dotsenko *et al.* (2010) fanden mit $65 \pm 13,6\%$ deutlich höhere Konzentrationen in einem entsprechenden Kollektiv. [25] Beide Autorengruppen bereiteten die Blutzellen vor der Analyse mittels Dichtezentrifugation auf, nutzten jedoch Systeme unterschiedlicher Hersteller. Auch die Analyse der gewonnenen Ergebnisse erfolgte durch unterschiedliche Gatingstrategien.

Hier zeigt sich eine Problematik im Zusammenhang mit der Dichtezentrifugation in dieser Population durch den nicht eindeutig definierten Anteil von Granulozyten in den Zellproben.

Eine eindeutige Einordnung der erhobenen Ergebnisse erscheint mir durch die unklare Zusammensetzung der CD184+ Zellfraktion, in Zusammenschau mit den heterogenen Ergebnissen vorgenannter Autoren, als nicht möglich. Erschwert wird die Interpretation durch einen signifikanten Gruppenunterschied ($p=0,026$) der präoperativ erhobenen Werte. CD184 konnte jedoch in Kombination mit weiteren Markern zur Identifizierung von EPC Subpopulationen genutzt werden. Die Ergebnisse werden in den Abschnitten der entsprechenden Marker diskutiert.

Interessanterweise zeigte sich bei CD184+ PBMC auch im Zeitverlauf ein signifikanter Unterschied ($p=0,028$) zwischen Therapie- und Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse sind jedoch, wie bereits betont, nur unter Vorbehalt zu interpretieren. Eine Überprüfung eines entsprechenden Zusammenhanges wäre mit einer für CD184+ Zellen angepassten Methodik notwendig.

4.1.3 Endotheliale Progenitorzellen

Wie bereits beschrieben ist eine Identifikation endothelialer Progenitorzellen (EPC) nicht allein über einen einzelnen Oberflächenmarker möglich. [67] Insbesondere zur Abgrenzung von hämatopoetischen Stammzellen können, wie zuvor gezeigt (siehe Abschnitt 1.3.3), Kombinationen unterschiedlicher Marker genutzt werden. Eine inverse Korrelation der Anzahl zirkulierender EPC mit kardiovaskulären Risiken ist hinlänglich bekannt. [45, 107] Auch eine Mobilisation von EPC nach myokardialer Ischämie

[60] sowie nach kardiochirurgischen Eingriffen [85], wurde bereits gezeigt. Es wurde jedoch erstmals der Einfluss einer ischämischen Remotepräkonditionierung (RIPC) auf EPC im Rahmen von kardiochirurgischen Eingriffen, untersucht.

ISHAGE CD34+

Die präoperativ gefundene durchschnittliche Konzentration von 645 Zellen (CD34+) pro ml Blut wies in den Einzelwerten eine hohe Streubreite auf. Diese Daten decken sich weitgehend mit den aktuellen Ergebnissen von Janssen *et al.* (2014) [49] und Patel *et al.* (2015) [77]. Beide Autoren nutzen zur Abschätzung der Zellzahlen ebenfalls die ISHAGE-Kriterien, fanden jedoch geringfügig höhere Konzentrationen, bei ähnlich hohen Streubreiten. Sowohl Egan *et al.* (2009) [29] als auch Dotsenko *et al.* (2010) [25] fanden deutlich höhere Konzentrationen, nutzten für ihre Analyse jedoch nicht das ISHAGE-Protokoll. Barnett *et al.* zeigten bereits 1998 in ihrer Arbeit zur Qualität der Quantifizierung von CD34+ Stammzellen die Vorteile des ISHAGE-Protokolls in Hinblick auf die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zwischen verschiedenen Laboren. [11] Heute gilt das Protokoll als Standardverfahren und wird von den Großteil der Labore genutzt, jedoch werden die Kriterien nicht immer korrekt umgesetzt, was Einfluss auf die Ergebnisse haben kann. [109]

Im zeitlichen Verlauf zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Therapie- und Kontrollgruppe. Es konnte jedoch ein höchst signifikanter Unterschied ($p=0,001$) der Zellkonzentrationen zwischen den Messzeitpunkten festgestellt werden. So zeigte sich eine Verdoppelung CD34+ EPC bereits sechs Stunden postoperativ. Jedoch fiel die Zellzahl bereits 48 h postOP wieder auf ihr Ursprungsniveau ab. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen von Egan *et al.* (2009), welche einen solchen Effekt nach perkutaner Koronarintervention (PCI) sahen. [29] Es wäre möglich, dass sich hier ein Verbrauch der zirkulierenden Zellen durch myokardiale Reparaturmechanismen zeigt. Interessanterweise erreichten die erhobenen Werte am sechsten postoperativen Tag ihr Maximum und stiegen somit wieder deutlich an. Dies könnte eine vermehrte Rekrutierung aus dem Knochenmark widerspiegeln, jedoch bedarf dieser Effekt weiterer Klärung.

Der zeitliche Verlauf zeigte sich, mit unterschiedlichem Signifikanzniveau, bei allen untersuchten Subpopulationen, wobei auch hier Egan *et al.* (2009) entsprechende Effekte für CD34+, CD133+, CD117+, CD34+/CD117+, CD184+ PBMC in ihren Untersuchungen bis 48 h nach Intervention sahen. [29]

Das CD34-Antigen ist der wichtigste Marker zur Identifikation hämatopoetischer Stammzellen. [91, 16] Die Identifizierung endothelialer Progenitorzellen ist jedoch durch die alleinige Analyse von CD34 nicht möglich. Hierzu werden weitere Marker benötigt. [67]

Mehrere Autoren untersuchten den therapeutischen Nutzen von CD34+ Stammzellen. [5] So behandelten Balogh *et al.* (2007) Patienten nach Herzinfarkt mit autologen intrakoronar applizierten CD34+ Stammzellen. Nach sechs Monaten fanden die Autoren eine tendenzielle Besserung der echokardiographisch bestimmten linksventrikulären Ejektionsfraktion. Die Daten erreichten jedoch nicht das Signifikanzniveau. [10] Auch Iwasaki *et al.* (2006) postulierten dosisabhängig positive Einflüsse auf die funktionelle Wiederherstellung nach Herzinfarkt, durch die Transplantation von CD34+ Stammzellen. [48]

ISHAGE CD133+

Die CD133+ Zellen wiesen zu 85% eine Koexpression von CD34+ auf. Dies ist etwas weniger als Quirici *et al.* (2001) fanden, es zeigte sich jedoch, dass analog zu den Angaben weiterer Autoren der Großteil der CD133+ Zellen diese Koexpression aufweisen. [84, 34] Der Vergleich mit den Ergebnissen von Powell *et al.* (2005) zeigt, dass die erhobenen Werte für CD34+/CD133+ EPC zu denen von Patienten mit KHK passen. [81] Auch bei umgekehrter Betrachtung zeigten sich im Vergleich mit anderen Autoren [77, 36] glaubhafte Werte. So exprimierten 55% der CD34+ Zellen gleichzeitig CD133. Egan *et al.* (2008) fanden jedoch erneut mit etwa 10% deutlich abweichende Werte. [30] Dies könnte unter Einbeziehung der Werte für CD34 und im Vergleich mit den Ergebnissen vorgenannter Autoren auf die Nutzung einer unzureichenden Gatingstrategie hinweisen, zudem wurde die Präsenz einer KHK nicht berücksichtigt.

Analog zu den Ergebnissen bei weiteren EPC-Subpopulationen [107] konnten Powell *et al.* (2005) zeigen, dass eine KHK mit verminderter Anzahl im Blut zirkulierender CD34+/CD133+ EPC einhergeht. [81] Die verminderte Anzahl zirkulierender EPC gilt als Prädiktor für Morbidität und Mortalität bei kardiovaskulär vorerkrankten Patienten. [107]

Die therapeutische Wirksamkeit von CD133+ EPC, durch Transplantation selbiger, konnte bereits von Stamm *et al.* (2003) [92] gezeigt werden und wurde später durch weitere Autoren bestätigt. [12, 3] Limitierend ist hierbei anzumerken, dass es sich bei den transplantierten Zellen um EPC aus dem Knochenmark handelte.

CD133+ EPC sowie ihre Subpopulationen, stellen somit einen hoffnungsvollen Ansatz in der Therapie der ischämischen Herzerkrankung dar. Es zeigten sich analog zu den Ergebnissen bei CD34+ auch hier keine signifikanten Unterschiede zwischen Therapie- und Kontrollgruppe, jedoch ebenso höchst signifikante Unterschiede ($p=0,001$) im zeitlichen Verlauf, bei ähnlichem Verlaufsmuster.

Die gefundenen CD133+ Zellen exprimierten zu 36% auch CD117. Im Umkehrschluss waren 26% der CD117+ Zellen auch CD133. Meines Wissens werden Daten zu dieser Population hier erstmals präsentiert. CD133+/CD117+ EPC exprimierten mit 89% zu einem hohen Anteil auch CD34.

ISHAGE CD117+

Präoperativ zeigte sich für CD117+ eine durchschnittliche Konzentration von 589 Zellen pro ml Blut. Wie auch in den anderen Zellpopulationen wiesen die Einzelwerte eine hohe Streubreite auf. Adams *et al.* (2008) untersuchten im Rahmen eines Marathonlaufes gesunde Probanden und fanden, bei abweichender Methodik, mit 2478 ± 245 Zellen pro ml Blut eine höhere Konzentration. [2]

CD117 spielt eine wichtige Rolle bei der Mobilisation von EPC [21], wird jedoch auch von anderen hämatopoetischen Stammzellen [27] und Mastzellen exprimiert. Weiter wird CD117 in der Diagnostik [61] und als Marker bei bestimmten Tumoren verwendet. [19] Da CD117 wenig spezifisch für EPC ist, sollte er nur als zusätzlicher Marker zur Identifikation von EPC genutzt werden. Dies könnte die im Vergleich zu CD34, CD133 und CD309 seltenere Nutzung dieses Markers [5] im Kontext von EPC erklären.

Bei der Betrachtung der Koexpression von CD117 auf CD34+ EPC im peripheren Blut zeigt sich in der Literatur ein inhomogenes Bild. So fanden Grundmann *et al.* (2007) bei 63,3% ($\pm 5,3$) der CD34+ EPC auch CD117 [36], dagegen fanden Egan *et al.* (2009) diese Koexpression nur bei 38,7% der KHK-Patienten. [29] Hier spielt sicherlich die unterschiedliche Methodik der Autoren eine Rolle. Mit 40,3% zeigten sich in dieser Arbeit Ergebnisse, welche denen von Egan *et al.* (2009) am nächsten kommen. Die abweichende Methodik dieser Autoren macht eine eindeutige Einordnung der Ergebnisse jedoch unmöglich.

Ebenso, wie bei der bereits gezeigten Kombination von CD133+ und CD117+, werden meines Wissens nach hier erstmals Daten zur zellulären Koexpression von CD34+/CD133+/CD117+ im peripheren Blut gezeigt. Für Knochenmark wurden diese Kombinationen von Laupheimer *et al.* (2014) [58] gezeigt.

Entsprechend der Ergebnisse der anderen untersuchten EPC-Subpopulationen zeigten sich auch bei CD117+, CD34/CD117+ und CD34+/CD133+/CD117+ EPC keine signifikanten Unterschiede zwischen Therapie- und Kontrollgruppe. Der zuvor gesehene höchst signifikante Unterschied ($p=0,001$) im Zeitverlauf, ohne Betrachtung der Gruppenzugehörigkeit, zeigte sich auch hier.

ISHAGE CD34+ CD184+

Ein weiterer im Zusammenhang mit EPC im peripheren Blut verwendeter Marker ist der SDF-1-Rezeptor CD184. Eine Koexpression mit CD34+ ist bereits bekannt. [70] Präoperativ zeigte sich für diese Kombination ein Wert von 37 Zellen (CD34+/CD184+) pro ml Blut. Patel *et al.* fanden kürzlich mit 974 Zellen pro ml einen deutlich höheren Wert. [77] Wyderka *et al.* (2012) fanden unter Anwendung der ISHAGE-Kriterien mit rund 2000 CD34+/CD184+ EPC einen noch höheren Wert. [112] Auch bei Betrachtung des relativen Anteils der CD34+/CD184+ EPC an CD34+ Zellen zeigte sich mit 6% ein deutlich niedrigerer Anteil als bei Patel *et al.* (2015), welche dies bei 53% der Zellen sahen. [77] Egan *et al.* (2008) fanden ähnliche Werte bei KHK Patienten. [30]

Bei den CD34+/CD133+/CD184+ EPC zeigten sich mit 22 Zellen pro ml Blut ebenfalls, im Vergleich mit Patel *et al.* (2015), abweichende Werte. Diese fanden mit 398 deutlich mehr Zellen pro ml Blut. [77]

Aufgrund der Ergebnisse vorgenannter Autoren ist in Betracht zu ziehen, dass die Werte für CD184+ EPC unterschätzt wurden und somit eine valide Aussage nicht sicher möglich ist.

4.1.4 Limitationen

Die präoperativen Probenentnahmen wurden im Rahmen der anästhesiologischen Vorbereitung entnommen. Es ist nicht sicher auszuschließen, dass es hierbei Abweichungen von dem vorgesehenen Procedere gab. Da jedoch der Kreis derer, die in die Durchführung der Studie einbezogen waren, begrenzt ist und Abweichungen im Bereich der Probenentnahmen, durch zeitliche Begrenzung auf die Narkosevorbereitung, nur gering sein können, ist davon auszugehen, dass dieser Faktor die Aussagekraft der vorliegenden Arbeit nicht gefährdet. Die Probenentnahmen in der postoperativen Phase wurden streng protokollbasiert durchgeführt und dokumentiert. Ebenso wurde bei der Verarbeitung der Proben ein streng standardisiertes Procedere angewendet. Hierdurch und durch die geringe Anzahl der involvierten Personen sollte eine Verfälschung der Ergebnisse durch unterschiedliche Untersucher gering sein. Im Bereich der Aufarbeitung waren mehrere Schritte

erforderlich, in denen eine genaue Quantifizierung des Untersuchungsmaterials notwendig war. Durch Mehrfachzählungen und Mittelung der Ergebnisse wurde der Einfluss gering gehalten, es ist jedoch eine gewisse Schwankungsbreite in diesem Bereich unvermeidbar. Zwar wäre eine Reduktion von Aufbereitungsschritten für die durchflusszytometrische Untersuchung durch Verwendung von Vollblutproben möglich, wie dies beispielsweise von Mariucci *et al.* (2010) [67] durchgeführt wurde, jedoch wäre die Detektion von MNC in der Durchflusszytometrie durch große Mengen anderer Zelltypen erschwert worden. Des Weiteren hätte so kein Material für die weiteren Untersuchungen in der Zellkultur zu Verfügung gestanden. Die Auswertung der durchflusszytometrisch erhobenen Daten wurde zur Vermeidung einer Beeinflussung, durch verschiedene Untersucher, nur durch den Verfasser dieser Arbeit durchgeführt und stichprobenartig durch Dr. rer. nat. Cornelia Lux kontrolliert. Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu wahren, wurde streng nach den Kriterien des ISHAGE-Protokolls [97] gearbeitet. Whitby *et al.* wiesen 2012 darauf hin, dass bei der Anwendung der ISHAGE-Kriterien in vielen Laboren Fehler auftreten, was die Vergleichbarkeit der Ergebnisse beeinflussen kann. [109] Mit dem Ziel, eine Beeinflussung der Ergebnisse durch die Konzentrationsänderungen anderer Zellpopulationen zu minimieren, wurden die erhobenen Werte auf das Blutvolumen bezogen. Hierbei ist jedoch zu bedenken, dass wiederum durch patientenseitige Verdünnungseffekte Abweichungen auftreten können.

Bei der statistischen Auswertung der gewonnenen Daten wiesen einige der untersuchten Subpopulationen nicht die bei der Durchführung der ANOVA geforderte Normalverteilung [54] auf. Der amerikanische Mathematiker James Stevens beschäftigte sich 1999 in seinem Buch „Intermediate statistics, A modern approach“ mit diesem Problem. Er konnte darstellen, dass eine Abweichung von der Normalverteilung nur bei sehr kleinen Stichproben einen relevanten Effekt aufweist. So propagierte er, dass bereits 10-20 Werte pro Messzelle bei mäßiger Abweichung von der Normalverteilung ausreichen, um valide Ergebnisse zu erhalten. [95] Die Anzahl der Werte pro Messzelle liegt in dieser Untersuchung mit je 13 Werten in der Kontroll- und je 12 in der Therapiegruppe im geforderten Bereich. Zudem erreichte unabhängig von der Normalverteilung, keine der untersuchten Subpopulationen, mit Ausnahme von CD184+ PBMC, das Signifikanzniveau in Bezug auf einen Gruppenunterschied. Eine Konsultation von Herrn Prof. Dr.-Ing. Günther Kundt vom Institut für Biostatistik und Informatik in Medizin und Altersforschung der Universitätsmedizin Rostock bestätigte die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte statistische Auswertung.

Thomas *et al.* zeigten 2008 erstmals zirkadiane Schwankungen bei der Zahl im Blut zirkulierender EPC. [101] Al Mheid *et al.* zeigten 2014 Abweichungen von der individuellen durchschnittlichen Zellzahl von bis zu $24 \pm 26\%$ bei CD34+ MNC und $44 \pm 40\%$ bei CD34+/CD133+ EPC, wobei bei beiden Populationen das Maximum am Abend (20:00 Uhr) beobachtet wurde. Ebenfalls untersucht wurden CFU, welche mit $54 \pm 36\%$ einen analogen Effekt aufwiesen, jedoch zeigte sich hier das Maximum erst um Mitternacht. Die niedrigsten Zellzahlen wurden bei den drei Populationen am Morgen (8:00 Uhr) beobachtet. [4] Entsprechende Mechanismen könnten sich dadurch bemerkbar machen, dass sechs der untersuchten Probanden an OP-Zeitpunkt 2, das heißt nach Abschluss der ersten Operation des Tages, operiert wurden und somit die Probenentnahme bei diesen Probanden später erfolgte. Relativieren sollte sich dieser Effekt auf die Gesamtauswertung jedoch dadurch, dass die Verteilung der Probanden, mit je drei

Fällen in Therapie- und Kontrollgruppe, gleich war. Eine Rolle könnte dieser Mechanismus jedoch bei der Bewertung der 6-h-postOP Daten spielen, da diese stets zu einer anderen Tageszeit als die übrigen Zeitpunkte abgenommen wurde.

Es sind mehrere patientenseitige Faktoren bekannt, welche zu Interferenzen mit EPC führen können. Einen möglichen Faktor stellt beispielsweise das Patientenalter dar. Chang *et al.* (2007) sahen im Mausmodell zwar keinen Einfluss des Alters auf die Gesamtzahl der EPC, jedoch führte ein höheres Alter zu einer verminderten Rekrutierung. Sie vermuteten hinter diesem Effekt eine verminderte Reaktionsfähigkeit des geschädigten Gewebes im Alter. [20] Das Patientenalter sollte in dieser Arbeit nur wenig Einfluss auf die erhobenen Daten haben, da mit einem Durchschnittsalter von 64,8 (SD: 11,5) Jahren eine eher ältere Population untersucht wurde.

Ein weiterer möglicher Einflussfaktor ist das Geschlecht. Mit 18 männlichen und sieben weiblichen Probanden wurde zwar eine in Bezug auf dieses Merkmal inhomogene Gruppe untersucht, die Verteilung des Geschlechts war in Therapie- und Kontrollgruppe jedoch nahezu gleich. Ergänzend hierzu konnten Stauffer *et al.* (2008) sowie Ruzkowska-Ciastek *et al.* (2015) in ihren Untersuchungen keinen Einfluss des Geschlechts auf EPC nachweisen. [93, 87] Fadini *et al.* (2008) fanden bei Frauen im gebärfähigen Alter eine zyklusabhängige Mobilisation von EPC. In einer postmenopausalen Vergleichspopulation zeigte sich jedoch kein Unterschied zum männlichen Geschlecht. [31] Lediglich eine Probandin war in der vorliegenden Untersuchung mit 49 Jahren im potenziell gebärfähigen Alter. Demnach kann davon ausgegangen werden, dass das Geschlecht keinen Einfluss auf die Ergebnisse dieser Arbeit hatte.

Der Einfluss einer KHK auf die Anzahl zirkulierender EPC wurde erstmals 2001 von Vasa *et al.* gezeigt. Entsprechende Patienten weisen demnach eine signifikant geringere Konzentration an EPC auf, als in einer gesunden Vergleichspopulation. [104] Egan *et al.* (2009) sowie weitere Autoren bestätigten diese Beobachtung. [29] Schmidt-Lucke *et al.* (2005) konnten zeigen, dass das Ausmaß dieser Verringerung der EPC-Konzentration mit der Progression der Erkrankung (KHK) korreliert. [88] Diese Beobachtung unterstützt die These von Werner *et al.* (2005), dass die Anzahl zirkulierender EPC invers, mit dem Risiko an einer kardialen Ursache zu versterben, korreliert ist. [107] Der Annahme folgend, dass Patienten, welche sich einer Bypass-Operation unterziehen, an einer interventionspflichtigen KHK leiden, weist die Population der vorliegenden Arbeit mit mindestens 76% einen hohen Anteil an diesem Merkmal auf. Die Verteilung der Probanden, welche sich keiner Bypass-Operation unterzogen, war mit je drei Fällen in Therapie- und Kontrollgruppe gleich. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die Präsenz einer KHK kaum Einfluss auf die jeweiligen Gruppen hatte. Das individuelle Ausmaß der EPC-Reduktion erklärt möglicherweise jedoch die hohe Streubreite in den Ergebnissen.

Neben dem bereits besprochenen Patientenalter und -geschlecht könnten auch weitere KHK-Risikofaktoren [18] wie arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Adipositas, Hyperlipidämie oder Nikotinabusus Einfluss auf EPC haben. Die Daten zum Einfluss der arteriellen Hypertonie sind in der Literatur uneinheitlich. So konnten Vasa *et al.* (2001) keinen signifikanten Einfluss auf die Anzahl von EPC nachweisen. [104] Dagegen fanden Werner *et al.* (2006) eine entsprechende Korrelation. [108] Zudem konnten Lee *et al.* (2014) in ihrem Review den positiven Einfluss verschiedener Antihypertonika

zeigen. [59] Bei der Hyperlipidämie hingegen konnten mehrere Studien eine Reduktion von EPC zeigen. [108] Hinzu kommt, dass ebenfalls ein positiver Einfluss einer medikamentösen Therapie (Statine) gezeigt werden konnte. [59] Ruszkowska-Ciastek *et al.* (2015) stellten kürzlich in ihrer Arbeit die kontroverse Diskussion zum Einfluss des Nikotinabusus und der Adipositas dar. [87] Kachamakova-Trojanowska *et al.* (2015) befassten sich unlängst mit dem Einfluss von Diabetes mellitus auf EPC. Auch bei dieser Erkrankung zeigten sich inhomogene Ergebnisse, die Mehrzahl der präsentierten Studien zeigte jedoch eine Reduktion von EPC durch Diabetes mellitus. [52] Durch den Ausschluss von Probanden unter Sulfonylharnstoff-Therapie konnte der Anteil von Diabetikern gesenkt werden, so dass der Einfluss dieses Faktors auf die Daten dieser Arbeit gesenkt wurde. Der Einfluss der anderen hier gezeigten Risikofaktoren kann aufgrund der geringen Fallzahl und der uneinheitlichen Bewertung in der Literatur nur unzureichend bewertet werden. Der Annahme folgend, dass Patienten mit einer KHK häufig mehrere, der hier gezeigten Risikofaktoren, aufweisen und der Anteil der Probanden mit KHK in der Versuchspopulation hoch ist, sollte der Einfluss der einzelnen Risikofaktoren auf die Ergebnisse dieser Arbeit jedoch gering sein.

Im Gegensatz zur KHK weisen Patienten mit Herzinsuffizienz signifikant erhöhte Konzentrationen von EPC auf. [59] Die Ausprägung dieser Steigerung ist abhängig vom Stadium der Herzinsuffizienz. [103] Damit stellt die Herzinsuffizienz einen möglichen Einflussfaktor auf diese Arbeit dar, der jedoch durch Ausschluss von Patienten mit hochgradig eingeschränkter Pumpfunktion (EF <30%) [57] aus der RIP-Heart-Studie begrenzt wurde.

Patienten mit KHK weisen häufig auch eine COPD auf. Es konnte zudem gezeigt werden, dass die Ausprägung einer KHK mit der Ausprägung der COPD korreliert. [26] Janssen *et al.* untersuchten 2014 den Einfluss der COPD auf hämatopoetische Stammzellen (HPC). Die Autoren fanden eine, im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe, geringere Konzentration von HPC bei COPD Patienten. Bei den ebenfalls untersuchten EPC konnten sie diesen Effekt jedoch nicht nachweisen. [49] Palange *et al.* (2006) haben dagegen eine signifikant geringere Konzentration, sowohl bei HPC als auch bei EPC gezeigt. [75] Weitere Autoren konnten zeigen, dass sowohl die Mobilisierung [99] als auch die Funktionalität [64] von EPC bei Patienten mit COPD eingeschränkt ist. Durch den Ausschluss von Patienten mit schwerer COPD sollte ein entsprechender Einfluss minimiert worden sein.

Interaktionen einer peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK) mit EPC sind nicht eindeutig geklärt. Wie aus dem Review von Lee *et al.* (2014) hervorgeht, bedarf es weiterer Untersuchungen zur Klärung eines entsprechenden Einflusses der pAVK. [59] Durch Ausschluss von Patienten mit pAVK Stadium Fontaine 3 und 4 sollte ein möglicher Einfluss auf die vorliegende Arbeit jedoch gering sein.

4.2 CFU-Hill

Die präoperativ gefundene durchschnittliche CFU-Hill-Koloniezahl pro ml Blut lag in der Analyse über alle Zeitpunkte bei 122 und in der Analyse über drei Zeitpunkte bei 118. In den Einzelwerten wiesen die Ergebnisse, wie auch in den durchflussszytometrischen Untersuchungen, eine hohe Streubreite auf. Palange *et al.* (2006) fanden in einem gesunden Kontrollkollektiv 30 ± 4 CFU pro ml Blut. [75] Die zu erwartenden Koloniezahlen bei gesunden Probanden beziffert der Hersteller bei Männern mit 35 ± 35 CFU pro ml Blut und bei Frauen mit 26 ± 23 CFU pro ml Blut. [94] Hill *et al.* (2003) propagierten, dass mit steigendem kardiovaskulärem Risiko die Zahl der CFU abnimmt. [45] Thum *et al.* (2005) demonstrierten wenig später, dass die Koloniezahl bei KHK-Patienten ausprägungsabhängig geringer ist als in der Normalbevölkerung. [102] Der Annahme folgend, dass ein Großteil der in der vorliegenden Studie untersuchten Probanden an einer interventionspflichtigen KHK leidet, wären niedrigere Werte, als in der Normalbevölkerung, zu erwarten.

Weder in der Analyse über alle Zeitpunkte noch in der Analyse über drei Zeitpunkte zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen Therapie- und Kontrollgruppe. Der zeitliche Verlauf der Messwerte war in beiden Analysen grenzwertig nicht signifikant. Dies könnte jedoch auch an der verhältnismäßig geringen Fallzahl liegen. Interessanterweise zeigte der zeitliche Verlauf der Messwerte ein, von den Ergebnissen der durchflussszytometrischen Untersuchungen, abweichendes Bild. So fielen postoperativ die Werte im Verhältnis zu den präoperativen Daten ab und stiegen erst im Verlauf an. Einen erneuten Abfall der Zellzahlen, wie in der Durchflussszytometrie, konnte in der Zellkultur nicht festgestellt werden. Es wäre denkbar, dass sich hier unterschiedliche Reifestufen der EPC zeigen, so dass die CFU-Hill-EPC postoperativ zur Wundheilung verbraucht werden und neue Zellen erst mit Verzögerung diese Reifestufe erreichen.

4.2.1 Limitationen

Ergänzend zu den Limitationen der Durchflussszytometrie, ist bei der Zellkultur insbesondere die relativ geringe Fallzahl zu nennen. Unter Zusammenschau aller Ergebnisse dieser Arbeit sind signifikante Unterschiede zwischen Therapie- und Kontrollgruppe in der Zellkultur jedoch unwahrscheinlich.

Untersucherabhängige Einflussfaktoren wurden dadurch vermindert, dass alle Untersuchungen der Zellkultur durch den Verfasser dieser Arbeit durchgeführt wurden. Wie auch bei der Analyse der Daten der Durchflussszytometrie wurden die Ergebnisse der Zellzählung stichprobenartig durch Dr. rer. nat. Cornelia Lux kontrolliert, um einen systematischen Fehler des Untersuchers zu vermeiden.

4.3 Fazit

Die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit sollen zur Klärung des Einflusses der ischämischen Remotepräkonditionierung (RIPC) auf die Mobilisierung von endothelialen Progenitorzellen (EPC) beitragen. Bei der RIPC handelt es sich um einen Therapieansatz zur Minimierung von Schäden durch nachfolgende Ischämien des Herzens. Die EPC spielen in der Regeneration eben solcher Schäden eine wichtige Rolle.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte, weder durch die durchflusszytometrischen Messungen, noch durch die Zellkultur, ein Zusammenhang zwischen der RIPC und der Mobilisierung von EPC nachgewiesen werden. Gezeigt wurde jedoch eine Mobilisierung unabhängig von dem Einfluss der RIPC. Vermutlich wurde diese ausgelöst durch den operativen Eingriff selbst sowie möglicherweise die damit zusammenhängende temporäre globale Ischämie der Herzens.

Dies deckt sich mit den zwischenzeitlich publizierten Ergebnissen anderer Autoren. Prasad *et al.* (2013) untersuchten unter anderem den Einfluss der RIPC unmittelbar vor einer perkutanen Koronarintervention (PCI) auf die Mobilisierung von EPC, wobei sich kein Zusammenhang zeigte. [82] Limitierend ist bei dieser Studie zu erwähnen, dass lediglich die Zellzahlen vor und nach PCI im Vergleich zu einer Kontrollgruppe untersucht wurden. Aussagen über verzögerte Effekte sind somit nicht möglich. Jimenez-Navarro *et al.* (2011) beobachteten die Konzentrationen an zirkulierenden EPC in der Woche nach einem Myokardinfarkt bei Patienten, in Abhängigkeit einer Angina pectoris im Zeitraum von 3-7 Tagen vor dem Infarkt. Sie konnten keinen signifikanten Unterschied feststellen. [50] Unter Einbeziehung der vorgenannten Autoren und den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit kann man davon ausgehen, dass die RIPC keinen signifikanten Einfluss auf die kurzfristige Mobilisierung von EPC hat.

Die inzwischen publizierten Ergebnisse der RIPHeart-Studie [68] sowie der ERICCA-Studie [40] geben Grund zur Neubewertung der klinischen Relevanz der RIPC. Beide Phase-III-Studien untersuchten erstmals in großen Studienpopulationen (RIPHeart n=1612, ERICCA n=1403) das Auftreten harter klinischer Endpunkte in Abhängigkeit einer präoperativen RIPC-Behandlung. Im Falle der RIPHeart-Studie waren die primären Endpunkte Tod, Myokardinfarkt, Schlaganfall, akutes Nierenversagen, neu aufgetretenes Vorhofflimmern und Delir. Die ERICCA-Studie untersuchte primär das Auftreten von Tod durch kardiale Ursachen, nicht-letale Myokardinfarkte, Schlaganfall und koronare Revaskularisierung. Beide Studien konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Therapie- und Kontrollgruppe beobachten. Diese Ergebnisse widersprechen der bisherigen Annahme einer kardioprotektiven Wirkung der RIPC und werden dementsprechend kontrovers diskutiert. Heusch *et al.* (2016) wiesen kürzlich darauf hin, dass methodische Schwächen der Studien und die ausschließliche Untersuchung im Rahmen von Herzoperationen keine generellen Aussagen über die kardioprotektive Wirksamkeit der RIPC zulassen. [44] Die abschließende Interpretation dieser Ergebnisse ist damit noch offen. In Zusammenschau der RIPHeart- und ERICCA-Studie mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit muss die klinische Relevanz dieser als gering eingeschätzt werden, da weder ein signifikanter Effekt zu beobachten war, noch die klinische Relevanz der RIPC abschließend geklärt ist.

Zur weiteren Klärung zellulärer Mechanismen der RIPC wären weiterführende Untersuchungen notwendig. So könnten andere Zellpopulationen, wie beispielsweise CD184+ Zellen, näher untersucht

werden. Eine größere Probandenzahl würde es erleichtern, die zu erwartenden geringen Unterschiede deutlicher abzugrenzen. Weiterhin wären Untersuchungen von über einen längeren Zeitraum regelmäßig wiederholten RIPC-Behandlungen interessant. Liang *et al.* (2015) fanden kürzlich Hinweise auf eine mögliche EPC-Mobilisierung durch Langzeit-RIPC, [62] auch Johnsen *et al.* (2016) zeigten, dass die Effektivität der RIPC von Anzahl und Dauer der RIPC-Zyklen abhängt. [51] Abschließend könnte eine nähere Untersuchung des beobachteten zeitlichen EPC-Konzentrationsverlaufs nach Herzoperation, insbesondere des Abfalls nach 48 Stunden, erfolgen. Zur Klärung des Phänomens wären beispielsweise weiterführende Untersuchungen zu Entwicklungsstadien und Aufenthaltsorten der EPC nach Herzoperationen im zeitlichen Verlauf interessant.

Zusammenfassung

Zahlreiche Untersuchungen der letzten Dekaden offenbarten Hinweise auf ein kardioprotektives Potenzial, sowohl der ischämischen Remotepräkonditionierung (RIPC) als auch der Transplantation endothelialer Progenitorzellen (EPC). Ein entsprechender Zusammenhang wurde jedoch zu Beginn dieser Arbeit noch nicht untersucht.

Zur Klärung des Einflusses der ischämischen Remotepräkonditionierung (RIPC) auf die Mobilisierung endothelialer Progenitorzellen (EPC) wurden 50 freiwillige Probanden, im Rahmen einer elektiven herzchirurgischen Operation mit Einsatz einer Herz-Lungen-Maschine, untersucht. Die Rekrutierung der Probanden erfolgte aus dem Studienkollektiv der RIPHeart-Studie, welche durch ihr Studiendesign eine doppelt-verblindete Randomisierung bot. Präoperativ wurden je nach Zuordnung zu Therapie- oder Kontrollgruppe mehrere Zyklen der RIPC durchgeführt. Den Probanden wurde sowohl präoperativ als auch zu definierten Zeitpunkten (6 Stunden, 48 Stunden, 6 Tage) postoperativ Blut entnommen, welches anschließend quantitativ auf EPC untersucht wurde. Zu diesem Zwecke wurden in der Durchflusszytometrie (FACS) unter Einhaltung der ISHAGE-Kriterien verschiedene Kombinationen der Oberflächenmarker CD34, CD133, CD117 und CD184 untersucht. Darüber hinaus wurden über eine spezifische Zellkultur (CFU-Hill) EPC identifiziert.

Innerhalb der untersuchten EPC-Populationen zeigten sich weder in der Durchflusszytometrie noch in der Zellkultur im Verlauf signifikante Unterschiede zwischen der Therapie- und Kontrollgruppe. Es konnten jedoch signifikante Veränderungen der Zellkonzentration im zeitlichen Verlauf, unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit, gezeigt werden. So imponierte nach initialem postoperativem Anstieg der EPC-Zahl nach 48 Stunden ein Abfall, gefolgt von einem erneuten Anstieg der Zellkonzentration am sechsten postoperativen Tag. Darüber hinaus wurden Hinweise auf Effekte bei einer Zellpopulation, welche nicht zu den originär untersuchten EPC zählen, gefunden. So zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Therapie- und Kontrollgruppe bei CD184+ Zellen. Da dieser Marker jedoch von unterschiedlichen Zellpopulationen exprimiert wird, ist eine spezifische Einordnung dieses Ergebnisses nicht möglich.

Die durch diese Arbeit gewonnenen Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass eine kurz vor der Operation durchgeführte RIPC keinen Einfluss auf die Mobilisierung von EPC hat. Die Operation selbst scheint jedoch ein starker Trigger für eine solche Mobilisierung zu sein.

Thesen

1. Eine unmittelbar präoperativ durchgeführte ischämische Remotepräkonditionierung durch wiederholte Ischämie der Armmuskulatur im Rahmen von herzchirurgischen Operationen, führt nicht zu einer vermehrten Mobilisierung von endothelialen Progenitorzellen.
2. Herzchirurgische Operationen unter Verwendung einer Herz-Lungen-Maschine stellen einen starken Induktor für die Mobilisierung von endothelialen Progenitorzellen dar.
3. Die Mobilisierung der endothelialen Progenitorzellen, im Rahmen von herzchirurgischen Operationen unter Verwendung einer Herz-Lungen-Maschine, weist nach einem initialen Anstieg der Konzentration einen Abfall gefolgt von einem erneuten Anstieg auf. Es kann daher von einem mindestens biphasischen Verlauf ausgegangen werden.

Literaturverzeichnis

1. Abbott J, Huang Y, Liu D et al (2004) Stromal cell-derived factor-1 α plays a critical role in stem cell recruitment to the heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury. *Circulation* 110(21): 3300–3305.
2. Adams V, Linke A, Breuckmann F et al (2008) Circulating progenitor cells decrease immediately after marathon race in advanced-age marathon runners. *European journal of cardiovascular prevention and rehabilitation : official journal of the European Society of Cardiology, Working Groups on Epidemiology & Prevention and Cardiac Rehabilitation and Exercise Physiology* 15(5): 602–607.
3. Ahmadi H, Baharvand H, Ashtiani SK et al (2007) Safety analysis and improved cardiac function following local autologous transplantation of CD133(+) enriched bone marrow cells after myocardial infarction. *Current neurovascular research* 4(3): 153–160
4. Al Mheid I, Corrigan F, Shirazi F et al (2014) Circadian variation in vascular function and regenerative capacity in healthy humans. *Journal of the American Heart Association* 3(3): e000845.
5. Alev C, Li M, Asahara T (2011) Endothelial progenitor cells: A novel tool for the therapy of ischemic diseases. *Antioxidants and Redox Signaling* 15(4): 949–965.
6. Asahara T, Kawamoto A (2004) Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 287(3): C572–C579.
7. Asahara T, Masuda H, Takahashi T et al (1999) Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circulation Research* 85(3): 221–228
8. Asahara T, Murohara T, Sullivan A et al (1997) Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275(5302): 964–967.
9. Asahara T, Takahashi T, Masuda H et al (1999) VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO Journal* 18(14): 3964–3972
10. Balogh L, Czuriga I, Hunyadi J et al (2007) Effects of autologous bone marrow derived CD34+ stem cells on the left ventricular function following myocardial infarction (A csontvelo eredetu CD34+ ossejtek hatasa a bal kamra funkciojara akut miokardialis infarktust kovetoen). *Orvosi hetilap* 148(6): 243–249.
11. Barnett D, Granger V, Storie I et al (1998) Quality assessment of CD34+ stem cell enumeration: experience of the United Kingdom National External Quality Assessment Scheme (UK NEQAS) using a unique stable whole blood preparation. *British journal of haematology* 102(2): 553–565
12. Bartunek J, Vanderheyden M, Vandekerckhove B et al (2005) Intracoronary injection of CD133-positive enriched bone marrow progenitor cells promotes cardiac recovery after recent myocardial infarction: feasibility and safety. *Circulation* 112(9 Suppl): 83.
13. Bhattacharya V, Shi Q, Ishida A et al (2000) Administration of granulocyte colony-stimulating factor enhances endothelialization and microvessel formation in small-caliber synthetic vascular grafts. *Journal of Vascular Surgery* 32(1): 116–123.

14. Birnbaum Y, Hale S, Kloner R (1997) Ischemic preconditioning at a distance: Reduction of myocardial infarct size by partial reduction of blood supply combined with rapid stimulation of the gastrocnemius muscle in the rabbit. *Circulation* 96(5): 1641–1646
15. Bleul CC, Fuhlbrigge RC, Casasnovas JM et al (1996) A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *Journal of Experimental Medicine* 184(3): 1101–1109
16. Bonnet D (2003) Biology of human bone marrow stem cells. *Clinical and experimental medicine* 3(3): 140–149.
17. Bot I, Daissormont I, Zernecke A et al (2014) CXCR4 blockade induces atherosclerosis by affecting neutrophil function. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 74: 44–52.
18. Bundesärztekammer (BÄK), Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV), Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) Nationale VersorgungsLeitlinie Chronische KHK – Langfassung, 3. Auflage. Version 1. 2014
19. Casciato DA, Territo MC (2009) Manual of clinical oncology, 6th ed. Spiral manual. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
20. Chang EI, Loh SA, Ceradini DJ et al (2007) Age decreases endothelial progenitor cell recruitment through decreases in hypoxia-inducible factor 1alpha stabilization during ischemia. *Circulation* 116(24): 2818–2829.
21. Dentelli P, Rosso A, Balsamo A et al (2007) C-KIT, by interacting with the membrane-bound ligand, recruits endothelial progenitor cells to inflamed endothelium. *Blood* 109(10): 4264–4271.
22. Dickson EW, Reinhardt CP, Renzi FP et al (1999) Ischemic preconditioning may be transferable via whole blood transfusion: Preliminary evidence. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis* 8(2): 123–129
23. Dimmeler S, Aicher A, Vasa M et al (2001) HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway. *Journal of Clinical Investigation* 108(3): 391–397.
24. Ding Y-F, Zhang M-M, He R-R (2001) Role of renal nerve in cardioprotection provided by renal ischemic preconditioning in anesthetized rabbits. *Acta Physiologica Sinica* 53(1): 7–12
25. Dotsenko O, Xiao Q, Xu Q et al (2010) Bone marrow resident and circulating progenitor cells in patients undergoing cardiac surgery. *The Annals of thoracic surgery* 90(6): 1944–1951.
26. Dursunoglu N, Dursunoglu D, Yildiz AI et al (2015) Severity of coronary atherosclerosis in patients with COPD. *The clinical respiratory journal*.
27. Edling CE, Hallberg B (2007) c-Kit--a hematopoietic cell essential receptor tyrosine kinase. *The international journal of biochemistry & cell biology* 39(11): 1995–1998.
28. Egan CG, Caporali F, Capecchi PL et al (2011) Levels of circulating CXCR4-positive cells are decreased and negatively correlated with risk factors in cardiac transplant recipients. *Heart and vessels* 26(3): 258–266.
29. Egan CG, Caporali F, Huqi AF et al (2009) Reduced levels of putative endothelial progenitor and CXCR4+ cells in coronary artery disease: kinetics following percutaneous coronary intervention and association with clinical characteristics. *Thrombosis and Haemostasis* 101(6): 1138–1146

-
30. Egan CG, Lavery R, Caporali F et al (2008) Generalised reduction of putative endothelial progenitors and CXCR4-positive peripheral blood cells in type 2 diabetes. *Diabetologia* 51(7): 1296–1305.
 31. Fadini GP, Kreutzenberg S de, Albiero M et al (2008) Gender differences in endothelial progenitor cells and cardiovascular risk profile: the role of female estrogens. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 28(5): 997–1004.
 32. Gallacher L, Murdoch B, Wu DM et al (2000) Isolation and characterization of human CD34(-)Lin(-) and CD34(+)Lin(-) hematopoietic stem cells using cell surface markers AC133 and CD7. *Blood* 95(9): 2813–2820
 33. Gho B, Schoemaker RG, Van den Doel, M.A. et al (1996) Myocardial protection by brief ischemia in noncardiac tissue. *Circulation* 94(9): 2193–2200
 34. Giebel B, Corbeil D, Beckmann J et al (2004) Segregation of lipid raft markers including CD133 in polarized human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 104(8): 2332–2338.
 35. Greiner Bio-One GmbH (2013) Leukosep™. Lymphozytenseparation aus Vollblut. https://www.gbo.com/fileadmin/user_upload/Downloads/Product_Flyers/Product_Flyers_BioScience/Flyers_German/Allg_Laborart/F073031_Leucosep_D.pdf. Zugegriffen: 16. Juli 2015
 36. Grundmann F, Scheid C, Braun D et al (2007) Differential increase of CD34, KDR/CD34, CD133/CD34 and CD117/CD34 positive cells in peripheral blood of patients with acute myocardial infarction. *Clinical research in cardiology : official journal of the German Cardiac Society* 96(9): 621–627.
 37. Hajrasouliha AR, Tavakoli S, Ghasemi M et al (2008) Endogenous cannabinoids contribute to remote ischemic preconditioning via cannabinoid CB(2) receptors in the rat heart. *Eur J Pharmacol*
 38. Hall R (2013) Identification of inflammatory mediators and their modulation by strategies for the management of the systemic inflammatory response during cardiac surgery. *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia* 27(5): 983–1033.
 39. Hausenloy DJ (2013) Cardioprotection techniques: Preconditioning, postconditioning and remote conditioning (basic science). *Current Pharmaceutical Design* 19(25): 4544–4563.
 40. Hausenloy DJ, Candilio L, Evans R et al (2015) Remote Ischemic Preconditioning and Outcomes of Cardiac Surgery. *N Engl J Med* 373(15): 1408–1417.
 41. Hausenloy DJ, Yellon DM (2008) Remote ischaemic preconditioning: Underlying mechanisms and clinical application. *Cardiovascular Research* 79(3): 377–386.
 42. Healy DA, Clarke Moloney M, McHugh SM et al (2014) Remote ischaemic preconditioning as a method for perioperative cardioprotection: Concepts, applications and future directions. *International Journal of Surgery* 12(10): 1093–1099.
 43. Heeschen C, Aicher A, Lehmann R et al (2003) Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. *Blood* 102(4): 1340–1346.
 44. Heusch G, Gersh BJ (2016) ERICCA and RIPHeart: two nails in the coffin for cardioprotection by remote ischemic conditioning? Probably not! *European Heart Journal* 37(2): 200–202.
 45. Hill J, Zalos G, Halcox J et al (2003) Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *New England Journal of Medicine* 348(7): 593–600.

-
46. Holmes K, Roberts OL, Thomas AM et al (2007) Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cellular signalling* 19(10): 2003–2012.
 47. Irollo E, Pirozzi G (2013) CD133: to be or not to be, is this the real question? *American journal of translational research* 5(6): 563–581
 48. Iwasaki H, Kawamoto A, Ishikawa M et al (2006) Dose-dependent contribution of CD34-positive cell transplantation to concurrent vasculogenesis and cardiomyogenesis for functional regenerative recovery after myocardial infarction. *Circulation* 113(10): 1311–1325.
 49. Janssen WJ, Yunt ZX, Muldrow A et al (2014) Circulating hematopoietic progenitor cells are decreased in COPD. *COPD* 11(3): 277–289.
 50. Jimenez-Navarro MF, Caballero-Borrego J, Rodriguez-Losada N et al (2011) Influence of preinfarction angina on the release kinetics of endothelial progenitor cells and cytokines during the week after infarction. *European journal of clinical investigation* 41(11): 1220–1226.
 51. Johnsen J, Pryds K, Salman R et al (2016) The remote ischemic preconditioning algorithm: effect of number of cycles, cycle duration and effector organ mass on efficacy of protection. *Basic research in cardiology* 111(2): 10.
 52. Kachamakova-Trojanowska N, Bukowska-Strakova K, Zukowska M et al (2015) The real face of endothelial progenitor cells - Circulating angiogenic cells as endothelial prognostic marker? *Pharmacological Reports* 67(4): 793–802.
 53. Kharbanda RK, Peters M, Walton B et al (2001) Ischemic preconditioning prevents endothelial injury and systemic neutrophil activation during ischemia-reperfusion in humans in vivo. *Circulation* 103(12): 1624–1630
 54. Köhler W, Schachtel G, Voleske P (2012) *Biostatistik. Eine Einführung für Biologen und Agrarwissenschaftler*, 5., aktualisierte und erw. Aufl. Springer-Lehrbuch. Springer, Berlin
 55. Konstantinov IE, Li J, Cheung MM et al (2005) Remote ischemic preconditioning of the recipient reduces myocardial ischemia-reperfusion injury of the denervated donor heart via a Katp channel-dependent mechanism. *Transplantation* 79(12): 1691–1695
 56. Kuzuya T, Hoshida S, Yamashita N et al (1993) Delayed effects of sublethal ischemia on the acquisition of tolerance to ischemia. *Circulation Research* 72(6): 1293–1299
 57. Lang RM, Bierig M, Devereux RB et al (2005) Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. *Journal of the American Society of Echocardiography : official publication of the American Society of Echocardiography* 18(12): 1440–1463.
 58. Laupheimer M, Skorska A, Große J et al (2014) Selective Migration of Subpopulations of Bone Marrow Cells along an SDF-1 α and ATP Gradient. *Bone Marrow Research* 2014(3): 1–10.
 59. Lee PSS, Poh KK (2014) Endothelial progenitor cells in cardiovascular diseases. *World journal of stem cells* 6(3): 355–366.
 60. Leone A, Rutella S, Bonanno G et al (2005) Mobilization of bone marrow-derived stem cells after myocardial infarction and left ventricular function. *European Heart Journal* 26(12): 1196–1204.

61. Leong AS-Y, Cooper K, Leong FJW-M (2003) Manual of diagnostic antibodies for immunohistology, 2. ed. Greenwich Medical Media, London
62. Liang Y, Li YP, He F et al (2015) Long-term, regular remote ischemic preconditioning improves endothelial function in patients with coronary heart disease. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica ... [et al.]* 48(6): 568–576.
63. Liem DA, Verdouw PD, Ploeg H et al (2002) Sites of action of adenosine in interorgan preconditioning of the heart. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 283(1 52-1): H29-H37
64. Liu X, Xie C (2012) Human endothelial progenitor cells isolated from COPD patients are dysfunctional. *Molecular and cellular biochemistry* 363(1-2): 53–63.
65. Ma N, Ladilov Y, Moebius JM et al (2006) Intramyocardial delivery of human CD133+ cells in a SCID mouse cryoinjury model: Bone marrow vs. cord blood-derived cells. *Cardiovascular Research* 71(1): 158–169.
66. Marber MS, Latchman DS, Walker JM et al (1993) Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. *Circulation* 88(3): 1264–1272
67. Mariucci S, Rovati B, Bencardino K et al (2010) Flow cytometric detection of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells in healthy subjects. *International Journal of Laboratory Hematology* 32(1 PART.1): e40-e48.
68. Meybohm P, Bein B, Brosteanu O et al (2015) A Multicenter Trial of Remote Ischemic Preconditioning for Heart Surgery. *The New England journal of medicine* 373(15): 1397–1407.
69. Meybohm P, Zacharowski K, Cremer J et al (2012) Remote ischaemic preconditioning for heart surgery. *European Heart Journal* 33(12): 1423.
70. Möhle R, Bautz F, Rafii S et al (1998) The chemokine receptor CXCR-4 is expressed on CD34+ hematopoietic progenitors and leukemic cells and mediates transendothelial migration induced by stromal cell-derived factor-1. *Blood* 91(12): 4523–4530
71. Murphy P, Baggiolini M, Charo I et al (2000) International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacological Reviews* 52(1): 145–176
72. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA (1986) Preconditioning with ischemia: A delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74(5): 1124–1136
73. Nesselmann C, Li W, Ma N et al (2010) Stem cell-mediated neovascularization in heart repair. *Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease* 4(1): 27–42.
74. Oxman T, Arad M, Klein R et al (1997) Limb ischemia preconditions the heart against reperfusion tachyarrhythmia. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 273(4 42-4): H1707-H1712
75. Palange P, Testa U, Huertas A et al (2006) Circulating haemopoietic and endothelial progenitor cells are decreased in COPD. *The European respiratory journal* 27(3): 529–541.
76. Patel HH, Moore J, Hsu AK et al (2002) Cardioprotection at a distance: Mesenteric artery occlusion protects the myocardium via an opioid sensitive mechanism. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 34(10): 1317–1323

77. Patel RS, Li Q, Ghasemzadeh N et al (2015) Circulating CD34+ progenitor cells and risk of mortality in a population with coronary artery disease. *Circulation Research* 116(2): 289–297.
78. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D et al (2000) Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 95(3): 952–958
79. Peled A, Petit I, Kollet O et al (1999) Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. *Science* 283(5403): 845–848.
80. Pell TJ, Baxter GF, Yellon D et al (1998) Renal ischemia preconditions myocardium: Role of adenosine receptors and ATP-sensitive potassium channels. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 44(5): H1542-H1547
81. Powell TM, Paul JD, Hill JM et al (2005) Granulocyte colony-stimulating factor mobilizes functional endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 25(2): 296–301.
82. Prasad A, Gössl M, Hoyt J et al (2013) Remote ischemic preconditioning immediately before percutaneous coronary intervention does not impact myocardial necrosis, inflammatory response, and circulating endothelial progenitor cell counts: A single center randomized sham controlled trial. *Catheterization and Cardiovascular Interventions* 81(6): 930–936.
83. Przyklenk K, Bauer B, Ovize M et al (1993) Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation* 87(3): 893–899
84. Quirici N, Soligo D, Caneva L et al (2001) Differentiation and expansion of endothelial cells from human bone marrow CD133(+) cells. *British journal of haematology* 115(1): 186–194
85. Roberts N, Xiao Q, Weir G et al (2007) Endothelial Progenitor Cells are Mobilized After Cardiac Surgery. *Annals of Thoracic Surgery* 83(2): 598–605.
86. Rudensky B, Yinnon A, Shutin O et al (2010) The cellular immunological responses of patients undergoing coronary artery bypass grafting compared with those of patients undergoing valve replacement. *European Journal of Cardio-thoracic Surgery* 37(5): 1056–1062.
87. Ruszkowska-Ciastek B, Sokup A, Leszcz M et al (2015) The number of circulating endothelial progenitor cells in healthy individuals--effect of some anthropometric and environmental factors (a pilot study). *Advances in medical sciences* 60(1): 58–63.
88. Schmidt-Lucke C, Rossig L, Fichtlscherer S et al (2005) Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair. *Circulation* 111(22): 2981–2987.
89. Schoemaker RG, van Heijningen CL (2000) Bradykinin mediates cardiac preconditioning at a distance. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 278(5 47-5): H1571-H1576
90. Shimizu M, Tropak M, Diaz RJ et al (2009) Transient limb ischaemia remotely preconditions through a humoral mechanism acting directly on the myocardium: Evidence suggesting cross-species protection. *Clinical Science* 117(5): 191–200
91. Simmons DL, Satterthwaite AB, Tenen DG et al (1992) Molecular cloning of a cDNA encoding CD34, a sialomucin of human hematopoietic stem cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 148(1): 267–271

-
92. Stamm C, Westphal B, Kleine H-D et al (2003) Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* 361(9351): 45–46.
 93. Stauffer B, MacEneaney O, Kushner E et al (2008) Gender and endothelial progenitor cell number in middle-aged adults. *Artery Research* 2(4): 156–160.
 94. StemCell Technologies Technical Manual. Culture and Quantification of CFU-Hill Colonies Using CFU-Hill Liquid Medium Kit, Version 3.1.0
 95. Stevens J (1999) Intermediate statistics. A modern approach, 2. ed. Lawrence Erlbaum Associates Publishers, Mahwah, N.J
 96. Strehlow K, Werner N, Berweiler J et al (2003) Estrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation. *Circulation* 107(24): 3059–3065.
 97. Sutherland D, Anderson L, Keeney M et al (1996) The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. *Journal of Hematotherapy and Stem Cell Research* 5(3): 213–226
 98. Takahashi T, Kalka C, Masuda H et al (1999) Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nature Medicine* 5(4): 434–438.
 99. Takahashi T, Suzuki S, Kubo H et al (2011) Impaired endothelial progenitor cell mobilization and colony-forming capacity in chronic obstructive pulmonary disease. *Respirology (Carlton, Vic.)* 16(4): 680–687.
 100. Tang Z-L, Dai W, Li Y-J et al (1999) Involvement of capsaicin-sensitive sensory nerves in early and delayed cardioprotection induced by a brief ischaemia of the small intestine. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 359(3): 243–247
 101. Thomas HE, Redgrave R, Cunningham MS et al (2008) Circulating endothelial progenitor cells exhibit diurnal variation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 28(3): 2.
 102. Thum T, Tsikas D, Stein S et al (2005) Suppression of endothelial progenitor cells in human coronary artery disease by the endogenous nitric oxide synthase inhibitor asymmetric dimethylarginine. *Journal of the American College of Cardiology* 46(9): 1693–1701.
 103. Valgimigli M, Rigolin GM, Fucili A et al (2004) CD34+ and endothelial progenitor cells in patients with various degrees of congestive heart failure. *Circulation* 110(10): 1209–1212.
 104. Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A et al (2001) Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circulation Research* 89(1): 7
 105. Walker DM, Yellon DM (1992) Ischaemic preconditioning: from mechanisms to exploitation. *Cardiovascular Research* 26(8): 734–739
 106. Walsh S, Tang T, Kullar P et al (2008) Ischaemic preconditioning during cardiac surgery: systematic review and meta-analysis of perioperative outcomes in randomised clinical trials. *European Journal of Cardio-thoracic Surgery* 34(5): 985–994.
 107. Werner N, Kosiol S, Schiegl T et al (2005) Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *New England Journal of Medicine* 353(10): 999–1007.

-
108. Werner N, Nickenig G (2006) Influence of cardiovascular risk factors on endothelial progenitor cells: limitations for therapy? *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 26(2): 257–266.
109. Whitby A, Whitby L, Fletcher M et al (2012) ISHAGE protocol: are we doing it correctly? *Cytometry. Part B, Clinical cytometry* 82(1): 9–17.
110. Wolfrum S, Schneider K, Heidbreder M et al (2002) Remote preconditioning protects the heart by activating myocardial PKC ϵ -isoform. *Cardiovascular Research* 55(3): 583–589
111. World Health Organization (2014) *World Health Statistics 2014*. World Health Organization, Geneva
112. Wyderka R, Wojakowski W, Jadczyk T et al (2012) Mobilization of CD34+CXCR4+ stem/progenitor cells and the parameters of left ventricular function and remodeling in 1-year follow-up of patients with acute myocardial infarction. *Mediators of inflammation* 2012: 564027.
113. Yamaguchi J-I, Kusano K, Masuo O et al (2003) Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation* 107(9): 1322–1328.
114. Zeymer U, Kastrati A, Rassaf T et al (2013) Kommentar zu den Leitlinien der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie (ESC) zur Therapie des akuten Herzinfarkts bei Patienten mit ST-Streckenhebung (STEMI). *Kardiologie* 7(6): 410–422.
115. Zhao Z-Q, Corvera J, Halkos M et al (2003) Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: Comparison with ischemic preconditioning. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 285(2 54-2): H579-H588

Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1	Gatingstrategie	14
Abbildung 2.2	Gatingstrategie	15
Abbildung 3.1	Boxplot-Darstellung vitale PBMC	19
Abbildung 3.2	ANOVA-Auswertung vitale PBMC	19
Abbildung 3.3	Boxplot-Darstellung CD184+	20
Abbildung 3.4	ANOVA-Auswertung CD184+	20
Abbildung 3.5	Boxplot-Darstellung Monozyten	21
Abbildung 3.6	ANOVA-Auswertung Monozyten	21
Abbildung 3.7	Boxplot-Darstellung CD34+	22
Abbildung 3.8	ANOVA-Auswertung CD34+	22
Abbildung 3.9	Boxplot-Darstellung CD34/133+	23
Abbildung 3.10	ANOVA-Auswertung CD34/133+	23
Abbildung 3.11	Boxplot-Darstellung CD34/117+	24
Abbildung 3.12	ANOVA-Auswertung CD34/117+	24
Abbildung 3.13	Boxplot-Darstellung CD34/184+	25
Abbildung 3.14	ANOVA-Auswertung CD34/184+	25
Abbildung 3.15	Boxplot-Darstellung CD34/133/117+	26
Abbildung 3.16	ANOVA-Auswertung CD34/133/117+	26
Abbildung 3.17	Boxplot-Darstellung CD34/133/184+	27
Abbildung 3.18	ANOVA-Auswertung CD34/133/184+	27
Abbildung 3.19	Boxplot-Darstellung CD133+	28
Abbildung 3.20	ANOVA-Auswertung CD133+	28
Abbildung 3.21	Boxplot-Darstellung CD133/117+	29
Abbildung 3.22	ANOVA-Auswertung CD133/117+	29
Abbildung 3.23	Boxplot-Darstellung CD117+	30
Abbildung 3.24	ANOVA-Auswertung CD117+	30
Abbildung 3.25	Boxplot-Darstellung CFU (alle).....	32
Abbildung 3.26	ANOVA-Auswertung CFU (alle)	32
Abbildung 3.27	Boxplot-Darstellung CFU (drei)	33
Abbildung 3.28	ANOVA-Auswertung CFU (drei).....	33

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.6.1	Ausschlussfaktoren zur Aufnahme in die RIPHeart-Studie	10
Tabelle 2.10.1	Volumina der unterschiedlichen Antikörper-Floureszenzfarbstoffe zur Herstellung eines Mastermix nach Nutzungsportionen	13
Tabelle 3.2.1	Ermittelte Konzentration vitaler mononuklearer Zellen pro ml Blut [$\times 10^3/\text{ml}$].....	19
Tabelle 3.2.2	Ermittelte Konzentration CD184+ Zellen pro ml Blut [$\times 10^3/\text{ml}$]	20
Tabelle 3.2.3	Ermittelte Konzentration CD14+ Monozyten pro ml Blut [$\times 10^3/\text{ml}$]	21
Tabelle 3.2.4	Ermittelte Konzentration CD34+ Stammzellen pro ml Blut [ml^{-1}]	22
Tabelle 3.2.5	Ermittelte Konzentration CD34+ CD133+ Stammzellen pro ml Blut [ml^{-1}]	23
Tabelle 3.2.6	Ermittelte Konzentration CD34+ CD117+ Stammzellen pro ml Blut [ml^{-1}]	24
Tabelle 3.2.7	Ermittelte Konzentration CD34+ CD184+ Stammzellen pro ml Blut [ml^{-1}]	25
Tabelle 3.2.8	Ermittelte Konzentration CD34+ CD133+ CD117+ Stammzellen pro ml Blut [ml^{-1}].....	26
Tabelle 3.2.9	Ermittelte Konzentration CD34+, CD133+ CD184+ Stammzellen pro ml Blut [ml^{-1}]....	27
Tabelle 3.2.10	Ermittelte Konzentration CD133+ Stammzellen pro ml Blut [ml^{-1}]	28
Tabelle 3.2.11	Ermittelte Konzentration CD133+ CD117+ Stammzellen pro ml Blut [ml^{-1}]	29
Tabelle 3.2.12	Ermittelte Konzentration CD117+ Stammzellen pro ml Blut [ml^{-1}]	30
Tabelle 3.3.1	Ermittelte CFU-Hill Kolonien pro ml Blut [ml^{-1}].	32
Tabelle 3.3.2	Ermittelte CFU-Hill Kolonien pro ml Blut [ml^{-1}]	33

Abkürzungsverzeichnis

AB	antibody, Antikörper
ACB	aortocoronary bypass, aortokoronarer Bypass
ACS	acute coronary syndrome, Akutes Koronarsyndrom
ANOVA	analysis of variance, Varianzanalyse
BÄK	Bundesärztekammer
C	Celsius
CD	Clusters of Differentiation
CFU	Colony Forming Unit
CGRP	Calcitonin Gene-Related Peptide
COPD	chronic obstructive pulmonary disease, Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CXCR4	C-X-C chemokine receptor type 4, CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
d	day(s), Tag(e)
dl	Deziliter
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPC	Endothelial Progenitor Cells, Endotheliale Vorläuferzellen
ERICCA	Effect of Remote Ischaemic preConditioning on clinical outcomes in patients undergoing Coronary Artery Bypass Graft surgery
FACS	fluorescence-activated cell sorting, Durchflusszytometrie
FcR-Block	Fragment crystallizable Receptor-Blocking Agent
FITC	Fluorescein
FLK1	Fetal Liver Kinase 1
FMO	Fluorescence minus one
G-CSF	granulocyte colony-stimulating factor
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
h	hour(s), Stunde(n)
HIV-1	human immunodeficiency virus 1
HPC	Hematopoietic Progenitor Cell, Hämatopoetische Stammzelle
ICP	ischemic preconditioning, ischämische Präkonditionierung
IPost	ischemic postconditioning, ischämische Postkonditionierung
IRI	ischemia-reperfusion injury, Ischämie-Reperfusionsschaden
Kat.	Katalognummer
KHK	Koronare Herzkrankheit
LESTR	Leukocyte-derived seven transmembrane domain receptor
LiHep	Lithium-Heparin
LSM	lymphocyte separation medium, Lymphozyten Trennmedium
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
NO	nitric oxide, Stickstoffoxid

OP	Operation
pAVK	Periphere Arterielle Verschlusskrankheit
PBMC	peripheral blood mononuclear cell(s), Mononukleare Zelle(n) aus peripherem Blut
PBS	phosphate buffered saline, phosphatgepufferte Salzlösung
PCI	Perkutane Koronarintervention
PE	Phycoerythrin
PE-Cy	Phycoerythrin-cyanin 7
PKC- ϵ	ProteinkinaseC (Isotyp ϵ)
postOP	Postoperativ
präOP	Präoperativ
RCX	Ramus circumflexus
RIPC	Remote ischemic preconditioning, ischämische Fern-Präkonditionierung
RIPHeart	remote ischemic preconditioning in heart surgery
RIVA	Ramus interventricularis anterior
SCFR	stem cell growth factor receptor, Stammzellfaktor-Rezeptor
SD	standard deviation, Standardabweichung
SDF-1	stromal derived factor-1
SIRS	Systemic inflammatory response syndrome
SWOP	Second window of protection
Syn.	Synonym
V	Volumen
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR-2	vascular endothelial growth factor receptor 2

Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die eingereichte Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und den benutzen Werken wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Rostock, den 14. März 2018

Philipp Sebastian Köntges